

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
GENEETIKA ÕPPETOOL

Johana Koppel

***Pseudomonas putida* transporteri geeni *lapE* transkriptsiooni sõltuvus globaalsetest regulaatoritest**

Bakalaureusetöö

Geenitehnoloogia

12 EAP

Juhendajad

MSc Hanna Moor

PhD Riho Teras

TARTU 2016

### ***Pseudomonas putida* transporteri geeni *lapE* transkriptsiooni sõltuvus globaalsetest regulaatoritest**

Käesolevas töös uuritakse *Pseudomonas putida* geeni *lapE* transkriptsiooni sõltuvust järgmistest globaalsetest regulaatoritest: Fis, PhoB ja RpoS. LapE moodustab LapB ja LapC-ga kompleksi, mis transpordib kleepvalku LapA-d raku pinnale, võimaldades bakteril kinnituda taime juurtele ning moodustada biofilmi. *P. putida* eelistab elada taime juurtel, sest taim eritab oma juurte kaudu mulda mitmesuguseid bakteritele vajalikke toitaineid. Samal ajal soodustab *P. putida* taime kasvu ning kaitseb seda patogeenide eest. Biofilmi moodustamine on *P. putida*'le oluline protsess ning seepärast reguleeritakse seda mitmeid radu pidi. Eelnevalt on põhjalikult uuritud *P. putida* biofilmi moodustamise regulatsiooni LapA posttranslatsioonilise regulatsiooni kaudu. Biofilmi regulatsioonist transporter Valkude kaudu on aga vähe teada. Käesolevas töös leiab kinnitust, et *lapE* geeni ees on vähemalt kaks promootorit, mis pole RpoS-st sõltuvad. Geeni *lapE* transkriptsioon ei sõltu PhoB-st LB söötmes, kuid Fis reguleerib transkriptsiooni nii positiivselt kui negatiivselt.

**Märksõnad:** Biofilm, *Pseudomonas putida*, Fis, LapE

**CERCS kood ja nimetus:**

- B220 – mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia
- B230 – geneetika, tsütogeneetika

### **The effects of global regulators on the transcription of *P. putida*'s transporter gene *lapE***

The main purpose of this report is to give an overview of the research about the transporter protein LapE in *Pseudomonas putida* which carries a huge adhesion protein called LapA to cell surface to bind with plant roots and form biofilm. *P. putida* prefers to live on plant roots since plants exude several important nutrients to soil through its roots. In exchange *P. putida* promotes plant growth and protects them from pathogens. As biofilm formation is an important phenotype for *P. putida*, it is regulated through different pathways. Previous studies have described the posttranslational regulation pathway of large externalized adhesion protein LapA. As the information about the regulation through transporter proteins is limited, this research focuses on the transcriptional regulation of transporter protein LapE. The goal of this study is to investigate which promoters are responsible for the transcription

of *lapE*. In addition, the aim was to elucidate the effect that  $\sigma$ -factor RpoS and regulator proteins, such as Fis and PhoB, have on *lapE* transcription.

**Keywords:** Biofilm, *Pseudomonas putida*, Fis, LapE

**CERCS code and designation:**

- B220 – genetics, cytogenetics
- B230 – microbiology, bacteriology, virology, mycology

## Sisukord

Infoleht .....	2
Sisukord.....	4
Kasutatud lühendid .....	6
Sissejuhatus .....	7
Kirjanduse ülevaade .....	8
1. <i>Pseudomonas putida</i> .....	8
2. LapA .....	9
3. LapE .....	12
4. Globaalne transkriptsiooni regulaator Fis.....	13
5. PhoB .....	14
6. $\Sigma$ -faktorid.....	14
Eksperimentaalne osa .....	17
1. Töö eesmärk .....	17
2. Materjal ja meetoodika.....	17
2.1. Bakterite kasvatamistingimused.....	17
2.2. PCR (polümeraasi ahelreaktsioon).....	19
2.3. DNA geelelektroforees.....	21
2.4. Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon.....	21
2.5. Promootorala kloneerimine transkriptsioonivektoris.....	22
2.6. B-galaktosidaasi eriaktiivsuse mõõtmine.....	23
2.7. DNA sekveneermine .....	23
2.8. DNA eraldamine .....	24
2.9. BW25113 $\Delta$ fis::Km <sup>R</sup> -i antibiootikumi resistentsusgeeni elimineerimine .....	24
2.10. Statistiline analüüs.....	24
3. Tulemused .....	25
3.1. Saadud konstruktid.....	25
3.2. Geeni <i>lapE</i> promootorid.....	25
3.3. Geeni <i>lapE</i> avaldumine logaritmilises kasvufaasis.....	27
3.4. RpoS-i mõju <i>lapE</i> avaldumisele <i>P. putida</i> 's .....	27
3.5. Fis-i mõju <i>lapE</i> avaldumisele <i>P. putida</i> 's .....	28
3.6. Fis-i mõju <i>lapE</i> avaldumisele <i>E. coli</i> 's .....	29
3.7. PhoB mõju <i>lapE</i> avaldumisele <i>P. putida</i> 's.....	31
4. Arutelu .....	32
Kokkuvõte .....	36

Summary.....	37
Kasutatud kirjandus .....	39
Lisad .....	43

## Kasutatud lühendid

ABC transporter – transportvalk, mis saab energiat ATP hüdroolüüsist (ingl k *ATP-binding cassette transporter*)

Fis – globaalne regulaatorvalk (ingl k *factor for inversion stimulation*)

RTX – valguperekond, mille liikmed sisaldavad 80-300 tandeemset kordusjärjestust (ingl k *repeats in toxins*)

c-di-GMP – tsükliline diguanosiinmonofosfaat

RACE – RNA 5' otsa määramise meetod (ingl k *rapid amplification of cDNA ends*)

LB – Luria-Bertani sööde

IPTG – isopropüül-β-tioglaktosiid

FLP – koht-spetsiifiline rekombinaas

FRT – FLP rekombinaas äratundmisjärjestus

nt – nukleotiid

TAE – puhver, mis sisaldab Tris-atsetaati ja EDTA-d (ingl k *Tris-acetate-EDTA*)

OD – optiline tihedus (ingl k *optical density*)

BamHI – *Bacillus amyloliquefaciens*'i tüüp II restriksiooni endonukleas X-gal – 5-bromo-4-kloro-3-indool-β-D-galaktopüranosiid

ONPG – orto-nitrofenüül-β-tioglaktosiid

ExoI – *Escherichia coli* eksoensüüm I

## Sissejuhatus

*Pseudomonas putida* on vähenõudlik bakter, mis suudab energia saamiseks kasutada erinevaid süsinikuallikaid ning elada nii õhus, vees kui mullas. Eelistatult elab *P. putida* aga taime juurtele kinnitunult, moodustades mitme põllumajanduslikult olulise taime juurtel biofilmi. Selliselt risosfääri nakatanud bakter kasutab energia allikana toitaineid, mida taim mulda eritab. Samal ajal konkureerib *P. putida* välja patogeenseid baktereid ning suurendab taime kasvu ja saagikust.

Biofilmi moodustamiseks peavad bakterid stabiilselt juurtele kinnituma. Selleks kasutab *P. putida* suurt kleepvalku LapA, mis võimaldab bakteril nii pinnale kui teistele bakteritele kinnituda. LapA arvatakse olevat vajalik esialgse pöörduva pinnaga seondumise üleminekul pöördumatuks.

Biofilmi moodustumist võidakse reguleerida mitmeid radu pidi. Siiani on enim uuritud juurtele kinnitumiseks vajaliku valgu LapA posttranslatsioonilist regulatsiooni. Biofilmi moodustumise regulatsioonil võivad olla olulised aga ka LapA transportervalgud LapE, LapB ja LapC, mis moodustavad ABC transporteri (ingl k *ATP-binding cassette transporter*). Kui transportereid on raku membraanis rohkem, siis võidakse ka suuremas hulgas LapA-d raku pinnale transportida, millega soodustatakse biofilmi teket. LapA transportervalkude LapE, LapB ja LapC geenide avaldumist on aga vähe uuritud.

Meie laboris on eelnevalt näidatud, et globaalne transkriptsiooni regulaator Fis (ingl k *factor for inversion stimulation*) soodustab biofilmi teket. Eelnevalt on leitud, et Fis soodustab biofilmi teket LapA kaudu, kuid Fis-i mõjust transportervalkudele on vähe teada. Käesoleva töö eesmärgiks on selgitada *lapE* transkriptsioonilist regulatsiooni üldisemalt ning leida, kas  $\sigma$ -faktor RpoS ning regulaatorid Fis ja PhoB reguleerivad *lapE* transkriptsiooni.

## Kirjanduse ülevaade

### 1. *Pseudomonas putida*

Perekonna *Pseudomonas* liigid on aeroobsed gramnegatiivsed gammaproteobakterid, mis suudavad lagundada väga erinevaid looduslikke ja inimtekkelisi süsinikuallikaid ning elada nii õhus, vees kui mullas (Palleroni, 1984, Timmis, 2002). *Pseudomonas putida*'t iseloomustab suhteliselt suur, umbes 6 miljoni nukleotiidi pikkune genoom (Ramos-Díaz ja Ramos, 1998), mis sisaldab mitmesuguste metabolismirade geene, võimaldades *P. putida*'l kasutada energia saamiseks väga erinevaid süsinikuallikaid, isegi saasteaineid nagu nafta ja fenool (Nelson jt., 2002). See võime on *P. putida* muutnud väga oluliseks uurimisobjektiks.

*P. putida* võib elada nii vabalt mullas kui taime juurtele kinnitununa (Timmis, 2002). Eelistatult elab *P. putida* taime juurtel, sest taim eritab oma juure apikaalmeristeemi kaudu mulda mitmesuguseid suhkruid, aminohappeid, orgaanilisi happeid jpm, luues bakteritele toitainerikka elukeskkonna (Dennis jt., 2010). Samal ajal soodustab *P. putida* taime kasvu ja kaitseb taime patogeenide eest, konkureerides koloniseerimisel taimepatogene välja (Weller, 1988).

Taime eritatud süsinikuallikate kättesaamiseks peab bakter liikuma juureni ning selle koloniseerima. Selleks, et kasulikud taimebakterid kasvavaid juuri nakataksid, eritab taim mulda atraktantidena toimivaid flavonoide, mida *P. putida* efektiivselt keskkonnast tuvastada suudab (Spaink, 1995, Hirsch jt., 2003). Seejärel liigub bakter oma polaarse viburite abil kemoatraktantide suunas ning risosfäärini jõudes koloniseerib selle (Harwood, 1989).

Taime juure koloniseerimiseks peavad risosfääri jõudnud bakterid stabiilselt taime juurele kinnituma, moodustades biofilmi. Biofilmi moodustamine on mikroobidele vajalik, sest see võimaldab lisaks stabiilselt pinnale kinnitumisele ka paremini ebasoodsates keskkonnatingimustes toime tulla, näiteks kaitseb biofilm mikroobe kuivamise ning pH kõikumiste eest (Garnett ja Matthews, 2012). Esmalt kinnituvad bakterid pinnale pöördumalt Van der Waalsi jõududega. Kui mikroobid suudavad pinnale kinnitunuks jääda ning neid ei kanta koheselt minema, siis läheb pöörduv kinnitumine üle pöördumatuks. (Donlan, 2002) Osad mikroobid kasutavad pöördumatuks kinnitumiseks pilisid, kuid *P. putida* ja temale sarnane teine *Pseudomonas* perekonna liige *Pseudomonas fluorescens* kasutavad selleks oma suurimat valku, adhesiini LapA (Hinsa jt., 2003). Pöördumatult kinnitunud mikroobirakud hakkavad pinnal jagunema ning moodustuvad mikrokolooniad. Rakujagunemise käigus hakatakse tootma ka rakuväliseid polümeere, mis moodustavad biofilmi maatriksi.



Biofilmimaatriks koosneb polüsahhariididest, valkudest, rakuvälisest DNA-st, polüpeptiididest jt biomolekulidest (Branda jt., 2005). Rakuväline maatriks katab biofilmi moodustavaid rakke ja eraldab neid väliskeskkonnast. Biofilmi maatriks on heterogeenne, sisaldades kanaleid, mille kaudu transporditakse hapnikku ja vajalikke toitaineid biofilmi ning ainevahetuse käigus tekkinud jääkaineid biofilmist välja. (Evans, 2000) Maatriksi täpne koostis võib liigiti väga suures ulatuses varieeruda (Hall-Stoodley jt., 2004), koosnedes näiteks *P. putida*'l ja *P. fluorescens*'il põhiliselt valkudest (Hinsa jt., 2003, Hinsa ja O'Toole, 2006, Moor jt., 2014) ning *P. aeruginosa*'l polüsahhariididest (Sutherland, 2001, Branda jt., 2005).

## 2. LapA

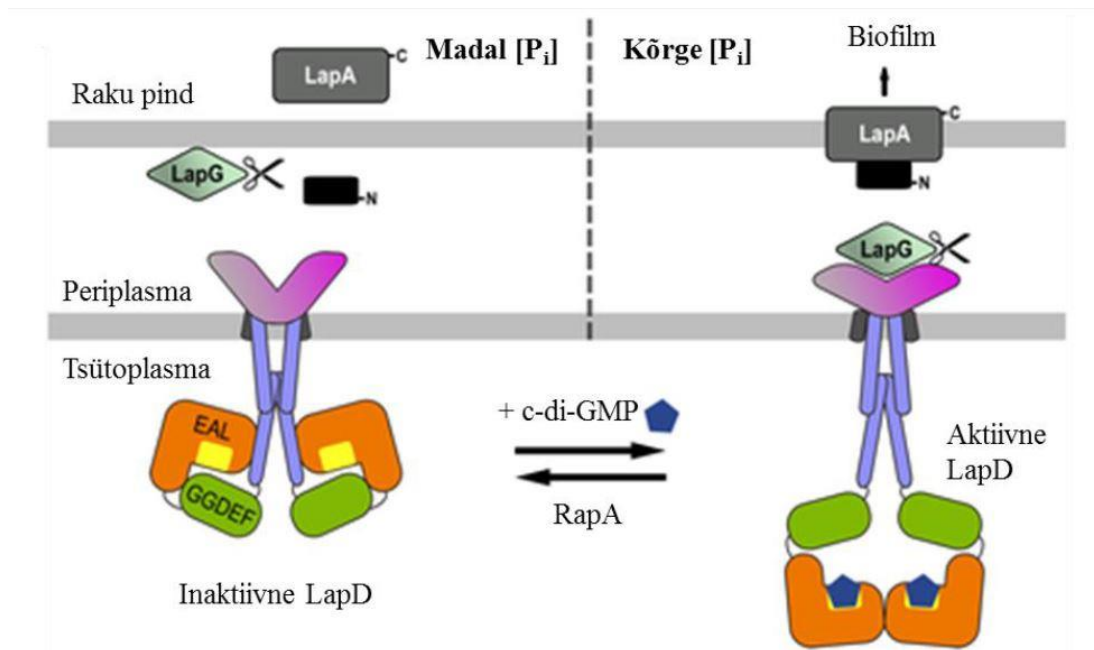
LapA on nii *P. putida* kui ka *P. fluorescens*'i biofilmi moodustumise keskne valk (Espinosa-Urgel jt., 2000, Hinsa jt., 2003, Hinsa ja O'Toole, 2006). Selle abil saavad bakterirakud stabiilselt juurte pinnale kinnituda ning üle minna esialgselt pöörduvalt kinnitumiselt pöördumatule, võimaldades edasise biofilmi moodustumise. (Boyd jt., 2014) Geeni *lapA* deleteerimisel langeb nii *P. putida* kui ka *P. fluorescens*'i võime biofilmi moodustada (Hinsa jt., 2003, Moor jt., 2014).

LapA on hiiglaslik bakteri pinnal asuv adhesiin ehk kleepvalk, mille molekulmass *P. fluorescens*'is on umbes 520 kDa ning *P. putida*'s 888 kDa (Yousef ja Espinosa-Urgel, 2007, Satchell, 2011, Winsor jt., 2011). LapA põhijärjestuse moodustavad valgu keskel paiknevad RTX (ingl k *repeats in toxins*) kordusjärjestused. Kordusjärjestuste ala on vajalik pinnaga seondumiseks, võimaldades biofilmi moodustumist. Valgu C-terminaalne ots on samuti vajalik pinnaga seondumiseks, kuid sisaldab ka tüüp 1 sekretsioonisüsteemi signaaljärjestus, mille abil saab LapA vastavat sekretsioonisüsteemi läbida. N-terminaalse otsaga kinnitub LapA aga bakteriraku pinnale ning see on vajalik posttranslatsiooniliseks regulatsiooniks. (Yousef ja Espinosa-Urgel, 2007)

Bakter saab LapA abil kinnituda nii hüdrofoobsetele kui ka hüdrofiilsetele pindadele. Kui LapA-d on raku pinnal palju, siis toimub seondumine mõlemale pinnale sarnase tõhususega. Juhul kui LapA-d on raku pinnal vähe, on eelistatud kinnitumine hüdrofoobsele pinnale. Kuigi LapA seondub erinevate pindadega, sõltub kinnitumise mehhanism siiski pinna omadustest. Hüdrofoobsele pinnale seondub LapA peamiselt RTX kordusjärjestustega, mis sisaldavad suures hulgas hüdrofoobseid aminohappeid. Mikroobi seondumisel pinnaga voltuvad LapA kordusjärjestused kokku, mis vähendab mikroobi ja substraadi vahelist

kaugust ning muudab seondumise tugevaks. (El-Kirat-Chatel jt., 2014) Hüdrofiilsete pindadega seondub LapA aga põhiliselt C-terminuse kaudu (Yousef ja Espinosa-Urgel, 2007). Sellise kinnitumise erinevuse tõttu seondub mikroob LapA kaudu hüdrofoobsetele pindadele tugevamalt kui hüdrofiilsetele, sest hüdrofoobsele pinnale kinnitumise korral on raku pinna ja substraadi pinna vaheline kaugus väiksem kui hüdrofiilse pinnaga seondudes. Lisaks alustatakse hüdrofoobse pinnaga seondudes biofilmi moodustamist kiiremini ja efektiivsemalt. (El-Kirat-Chatel jt., 2014)

LapA hulga reguleerimist bakteriraku pinnal on enim uuritud posttranslatsioonilisel tasemel (Joonis 1). LapA posttranslatsioonilise regulatsiooni eest vastutab periplasmas asuv proteaas LapG. Kui keskkonnas on liiga madal anorgaanilise fosfori kontsentratsioon, on tingimused biofilmi tekkeks sobimatud. (Monds jt., 2007) Sellises olukorras lagundab Pho regulonist kodeeritud fosfodiesteras RapA c-di-GMP-d (tsükliline diguanosiinmonofosfaat), langetades selle hulka rakus (Monds jt., 2007, Newell jt., 2009). Madala c-di-GMP kontsentratsiooni korral ei ole tsütoplasmamembraanis paiknev c-di-GMP retseptor LapD enam oma ligandga c-di-GMP-ga seotud ja muudab konformatsiooni nii, et ei suuda enam LapG-d siduda. Nii saab proteaas LapG vabalt periplasmas ringi liikuda ning lõigata LapA N-terminaalset otsa, vabastades LapA raku pinnalt keskkonda. (Monds jt., 2007) Kui keskkonnas on palju fosforit, siis on rakus ka palju c-di-GMP-d, mis seondub oma retseptori LapD-ga. LapD-s toimuvad konformatsioonilised muutused, mille tulemusena on see võimeline siduma LapG-d. LapD-ga seotud LapG ei saa periplasmas vabalt liikuda ega LapA N-terminaalset otsa lõigata. Selle tulemusel jääb LapA seotuks raku välismembraaniga, soodustades biofilmi teket. (Navarro jt., 2011, Newell jt., 2011)



**Joonis 1.** LapA posttranslatsiooniline regulatsioon (Navarro jt., 2011) LapA hulka raku pinnal reguleerib proteaas LapG, mis lõikab LapA N-terminaalse otsa ära, vabastades sellega LapA keskkonda. LapG on võimeline lõikama, kui ta liigub periplasmas vabalt ringi. Kui aga rakus on palju c-di-GMP-d, siis seondub c-di-GMP retseptor LapD LapG-ga. Seotud LapG ei saa periplasmas vabalt ringi liikuda ning LapA N-terminaalset otsa lõigata.

Lisaks posttranslatsioonilisele regulatsioonile kontrollitakse LapA hulka ka transkriptsioonilise regulatsiooni kaudu, millest on tänaseks aga oluliselt vähem teada. *P. putida* *lapA*-d transkribeeritakse juba varajases eksponentsiaalses kasvufaasis, kuid statsionaarsesse faasi sisenedes transkriptsiooni tase tõuseb veelgi. *P. putida* *lapA* transkriptsiooni reguleerib c-di-GMP koos FleQ-ga ja arvatavasti ka GacS/GacA kahekomponendiline regulatsioonisüsteem. C-di-GMP aktiveerib *lapA* transkriptsiooni, kuid eelnevalt on vajalik ka FleQ seondumine *lapA* promootoralale. Kahekomponendiline regulatsioonisüsteem GacS/GacA mõjutab *lapA* transkriptsiooni samuti positiivselt. (Martinez-Gil jt., 2014)

LapA on bakterile vajalik väljaspool rakku, kuid see sünteesitakse rakus sees. LapA jõudmiseks raku pinnale on vajalik ABC transporter LapEBC, mis koosneb kolmest valgust, LapE, LapB ja LapC. LapB on 74 kDa molekulmassiga valk, mis asub arvatavasti sisemembraanis ning sisaldab mitmeid transmembraanseid piirkondi ja ATPaasset domeeni C-terminaalses otsas. LapC, molekulmassiga 50 kDa, sisaldab ühte transmembraanset domeeni ning ühendab arvatavasti välismembraanset transporteri osa sisemembraanse osaga. LapE, molekulmassiga 48 kDa, on ilmselt välismembraanis asuv eksportvalk, mille kaudu

LapA rakust välja transporditakse. (Hinsa jt., 2003) *P. fluorescens*'is transkribeeritakse kõik transporterite valgud ühiselt promootorilt, kuid *P. putida*'s transkribeeritakse ühiselt promootorilt vaid *lapB* ja *lapC*, kuid *lapE* transkribeeritakse iseseisvalt promootorilt (Yousef-Coronado jt., 2008).

### 3. LapE

LapE on *P. putida* ja *P. fluorescens*'i välismembraanis asuv valk, mis osaleb biofilmi moodustamiseks hädavajaliku adhesiini LapA transportimisel välismembraani. Kui LapA on seni tuvastatud üksnes *Pseudomonas* perekonna mullabakterites, siis LapE homolooge leidub ka selle perekonna patogeenide seas. (Hinsa jt., 2003)

LapE-st ning selle ekspressiooni regulatsioonist on tänaseks vähe teada. Monds jt on vaadelnud *P. fluorescens*'i *lapE* transkriptsioonilist regulatsiooni sõltuvalt anorgaanilisest fosforist. Leiti, et fosfori kontsentratsioonist sõltuva regulaatori PhoB seondumisjärjestus *lapE* promootoralas on kattes  $\sigma$ -faktori -35 konsensus järjestusega. See andis alust arvata, et PhoB reguleerib *lapE* transkriptsioonilist regulatsiooni, konkureerides *lapE* promootoralaga seondumisel RNA polümeraasiga. Tulemustest selgus, et PhoB küll represseerib *lapE* transkriptsiooni, kuid biofilmi moodustumise langus madalal fosfori kontsentratsioonil ei ole siiski tingitud *lapE* negatiivsest geeniekspressiooni regulatsioonist. Kusjuures samasugused tulemused saadi ka *lapB* ja *lapC* geenide ekspressiooni uurimisel. (Monds jt., 2007)

Meie laboris on varasemalt *in silico* ennustatud *P. putida* *lapE* promootorale kaks PhoB seondumisjärjestust (Tabel 1, Riho Teras avaldamata andmed). Seondumisjärjestused on leitud nii matriitsahelale kui ka kodeerivale ahelale.

**Tabel 1** Geeni *lapE* promootoralale *in silico* ennustatud PhoB seondumisjärjestused. Ennustamisel kasutati *P. putida* spetsiifilist tõenäosust, arvutatud geeni algusest ülesvoolu. Organismi spetsiifiline võimalik miinimumskoor on -50,7 ning maksimumskoor 19,9.

Nimetus	Ahel	Kaugus geeni algusest	Ennustatud seondumisjärjestus	Skoor	P-väärtus
PhoB-1	matriits	-320...-298	CCAAAGTGACAAT ATTTTGTGCGC	6,7	P<0,0001
PhoB-2	kodeeriv	-181...-159	TTGTTGTCTAATA AGTGTGCATT	6,4	P<0,0001

Lisaks on meie laboris eelnevalt RACE (ingl k *rapid amplification of cDNA ends*) meetodil leitud *lapE* promootoralas kaks mRNA 5' otsa (Riho Teras avaldamata andmed), mis viitavad transkriptsiooni alguskohtadele.

Veel on *lapE* promootoralal eelnevalt näidatud *in vitro* kaks Fis-i seondumisjärjestust, Fis-E2 ja Fis-E3 (Lisa 1, Andrio Lahesaare avaldamata andmed). DNAas I jalajälje tulemusest lähtuvalt on Fis-E2 seondumisjärjestus arvatavasti madalama afiinsusega ning Fis-E3 seondumisjärjestusel on ilmselt Fis-i seondumise afiinsus kõrgem.

#### 4. Globaalne transkriptsiooni regulaator Fis

Globaalne regulaator Fis on väike homodimeerne DNA-d siduv valk, mis on suhteliselt konserveerunud *Enterobacteriaceae* ja *Pseudomonadaceae* sugukondades (Beach ja Osuna, 1998, Azam, 1999, Boswell jt., 2004). Fis seob ja painutab DNA-d reguleerides seeläbi nii transkriptsiooni, DNA superspiralisatsiooni (Schneider jt., 1999, Schneider jt., 2001, Travers jt., 2001) kui ka koht-spetsiifilist DNA rekombinatsiooni (Johnson jt., 1986, Finkel, 1992, Dorgai jt., 1993). Fis-i mõju transkriptsioonile võib olla nii positiivne, negatiivne kui ka sõltuda kasvufaasist (Bradley jt., 2007). Fis-i regulatiivne aktiivsus võib tuleneda sellest, et Fis võib seonduda ka mitte-spetsiifiliste järjestustega ning seal DNA-d painutada (Betermier jt., 1994, Pan jt., 1996).

Olenemata sellest, et Fis mõjutab *E. coli*'s umbes 5% geenide ekspressiooni, ei ole see *E. coli* jaoks eluks hädavajalik valk (Schneider jt., 1997). *P. putida*'le on Fis-i ekspresseerimine aga hädavajalik ning seni pole suudetud ühtegi *fis*-i deletsioonitüve saada (Jakovleva jt., 2012) ning ka alaekspressioon on väga ebastabiilne (Riho Teras avaldamata andmed). Seega on *P. putida*'s võimalik Fis-i funktsiooni uurida vaid Fis-i üleekspressiooni tüves.

Meie laboris on eelnevalt näidatud, et Fis soodustab *P. putida* biofilmi moodustumist (Jakovleva jt., 2012). Selleks, et selgitada, milliste geenide kaudu Fis biofilmi moodustumist reguleerida võib, viidi läbi *P. putida* transposoonmutagenees (Moor jt., 2014). Selles katses pommitati *P. putida* Fis-i üleekspressiooni tüve F15-e kromosoomi mini-Tn5 kassetiga, mis inserteerub suvalistesse piirkondadesse kromosoomis. Sellega sooviti leida Fis-i reguleeritavaid gene, mis on vajalikud *P. putida*'le biofilmi moodustamiseks, kuid praktilistel kaalutlustel kasutati transposoonmutantide selekteerimiseks ujumisvõime kui biofilmi moodustumise vastandfenotüübi hindamist. F15-e liikuvus on oluliselt halvem võrreldes metsiktüvega, seega otsiti transposoonmutante, mille ujumisvõime on oluliselt

paranenud. Kokku 76-st analüüsitud transposoonmutandist 68-l oli insertioon toimunud *lap* geenidesse. Nendest omakorda 62-l oli insertioon *lapA* geenis või LapA transportvalkude *lapE*, *lapB* ja *lapC* geenides (Moor jt., 2014). Antud tulemused äratasid huvi *lap* geenide edasiuurimiseks. Nüüdseks on näidatud, et Fis aktiveerib LapA ekspressiooni (Moor jt., 2014). Samuti on põgusalt vaadatud Fis-i mõju *lapE*, *lapB* ja *lapC* avaldumisele (Moor, 2013), millest selgus, et ühiselt promootorilt transkribeeritavate *lapB* ja *lapC* avaldumist Fis ei mõjuta, kuid võib reguleerida *lapE* avaldumist.

## 5. PhoB

PhoR/PhoB kahekomponendilise regulatsioonisüsteemi abil tunnetab bakter keskkonnas oleva anorgaanilise fosfori kontsentratsiooni ning reguleerib selle kaudu transkriptsiooni Pho regulonilt (Makino jt., 1989, Wanner, 1993). PhoR on selles regulatsioonisüsteemis sensorikinaas, mis anorgaanilise fosfori madalal kontsentratsioonil keskkonnas autofosforüleerub. Seejärel kantakse fosfaatjääk edasi transkriptsioonilisele regulaatorile PhoB, mis viimase aktiveerib. (Makino jt., 1989) Aktiveeritud PhoB seondub DNA-ga ja sigma faktor  $\sigma^{70}$ -ga, mille tulemusel aktiveeritakse transkriptsioon Pho reguloni geenidelt. Pho reguloni geenide korral seondub RNA-polümeraas  $\sigma^{70}$  kaudu ainult promootori -10 elemendiga, sest -35 seondumisjärjestus Pho reguloni promootoritel puudub (Kimura jt., 1989). Kui keskkonnas anorgaanilise fosfori kontsentratsioon langeb, siis PhoR ei autofosforüleeru ning PhoB defosforüleeritakse, lõpetades sellega ka transkriptsiooni Pho regulonilt (Makino jt., 1993, Makino jt., 1996).

PhoB koosneb kahest funktsionaalsest domeenist, N-terminaalsest ja C-terminaalsest. N-terminuses asub signaali vastuvõttev domeen, mida fosforüleerib PhoR. C-terminuses asub DNA-d siduv domeen. C-terminaalne domeen on vajalik veel  $\sigma^{70}$ -ga seondumise abil transkriptsiooni aktiveerimiseks, kui signaali vastuvõttev domeen on fosforüleeritud. Fosfaatjäägita N-terminaalne domeen vaigistab C-terminaalse domeeni ning transkriptsiooni Pho reguloni geenidelt ei aktiveerita. (Makino jt., 1993, Makino jt., 1996, Ellison ja McCleary, 2000)

## 6. $\Sigma$ -faktorid

Transkriptsiooni regulatsioon toimub peamiselt initsiatsiooni etapis. Kuigi transkriptsiooni viib läbi RNA polümeraasi apoensüüm, ei suuda see bakterites ise spetsiifilist

promootorjärjestust ära tunda ja sellega seonduda. Transkriptsiooni initsiatsiooniks peab  $\sigma$ -faktor RNA polümeraasiga seonduma, moodustades holoensüümi, mis suudab vajaliku promootori ära tunda. (Richard jt., 1969, Fassler ja Gussin, 1996) Bakterite kasvuks on hädavajalik  $\sigma$ -faktor  $\sigma^{70}$  (RpoD), mille abil transkribeeritakse koduhoidjaid geene. Lisaks  $\sigma^{70}$ -le kasutavad bakterid aga ka alternatiivseid  $\sigma$ -faktoreid, mis seonduvad erinevate promootorjärjestustega ning initsieerivad transkriptsiooni erinevatel keskkonna tingimustel. (Gross jt., 1998). Selline regulatsioon lubab bakteritel kiiresti keskkonnamuutustega kohaneda.

Sellised alternatiivsed  $\sigma$ -faktorid on näiteks  $\sigma^{38}$  (RpoS),  $\sigma^{32}$  (RpoH),  $\sigma^{54}$  (RpoN) ja  $\sigma^{28}$  (FliA/SigD). RpoS on statsionaarse faasi  $\sigma$ -faktor, mis on vajalik stressitingimustes ellu jäämiseks ja muutuvate keskkonnatingimustega kohanemiseks (Lange ja Hengge-Aronis, 1991). Kuumašoki korral on *E. coli*'le vajalik RpoH, mille abiga transkribeeritakse kuumašoki valke (Grossman jt., 1987). RpoN on vajalik bakteritele lämmastikuallikate omastamiseks (Köhler jt., 1989) ning FliA osaleb viburite sünteesi regulatsioonis (Hermann, 1991).

Iga  $\sigma$ -faktor tunneb ära spetsiifilise konsensusjärjestuse, millega ta seondub (Harley ja Reynolds, 1987). Põhilise osa  $\sigma$ -faktoritest moodustavad  $\sigma^{70}$  tüüpi  $\sigma$ -faktorid, mis seonduvad DNA ahelaga transkriptsiooni alguspunktist 10 ja 35 nukleotiidi ülesvoolu asuvatele järjestustele (Tabel 2). Selline  $\sigma$ -faktor on ka RpoS. RpoS-i konsensus on konserveerunud -10 element, -35 aga ei ole konserveerunud (Espinosa-Urgel jt., 1996).

RpoN on teise  $\sigma$ -faktorite perekonna,  $\sigma^{54}$ , ainus esindaja (Merrick jt., 1987, Sasse-Dwight ja Gralia, 1990). RpoN-i vahendatud transkriptsiooni initsiatsiooni toimumiseks peab aktivaator seonduma transkriptsiooni alguspunktist ülesvoolu asuvale võimendajale (Morris jt., 1994). RpoN-il on ka teistsugune konsensusjärjestus, tavapärase -10 ja -35 elementidega seondumise asemel seondub RpoN -12 ja -24 elementidega (Merrick, 1993).

**Tabel 2**  $\sigma$ -faktorite konsensusjärjestused

$\sigma^{70}$ perekond	Konsensusjärjestus			Allikas
	-35 element	Vahepealsete nukleotiidide arv	-10 element	
$\sigma^{70}$ (RpoD/ SigA)	TTGACA	16–18	TATAAT	(Harley ja Reynolds, 1987, Helmann, 1995)
$\sigma^{38}$ (RpoS)			CTATACT	(Espinosa-Urgel jt., 1996)
$\sigma^{32}$ (RpoH)	CTTGAAA	11–16	CCCATnT*	(Gross, 1996)
$\sigma^{28}$ (FliA/ SigD)	TAAA	15	GCCGATAAA	(Helmann, 1991)
$\sigma^{54}$ perekond	Konsensusjärjestus			Allikas
	-24 element	Vahepealsete nukleotiidide arv	-12 element	
$\sigma^{54}$ (RpoN)	TGGCAC	5	TTGCW**	(Merrick, 1993)

\* n tähistab kõiki nelja võimalikku nukleotiidi

\*\* W tähistab A või T nukleotiidi



# Eksperimentaalne osa

## 1. Töö eesmärk

*Pseudomonas putida* biofilmi moodustumise keskne valk on LapA, kuid biofilmi moodustumine võib olla reguleeritud ka LapA transportervalkude kaudu. Kui transportereid on rakumembraanis rohkem, on võimalik, et LapA-d transporditakse suuremas hulgas raku pinnale, millega soodustatakse biofilmi teket. Sellest lähtuvalt on käesoleva töö laiemaks eesmärgiks selgitada välja, kuidas on reguleeritud *lapE* transkriptsioon. Täpsemalt, milliste promootorite kaudu regulatsioon toimub ning millised regulaatorid *lapE* transkriptsiooni mõjutavad.

Meie laboris on eelnevalt näidatud, et globaalne transkriptsiooni regulaator Fis soodustab *P. putida* biofilmi moodustumist (Jakovleva jt., 2012). Samuti on eelnevalt *in vitro* näidatud *lapE* promootoralas kaks Fis-i seonudmisjärjestust (Lisa 1, Andrio Lahesaare avaldamata andmed). Sellest lähtuvalt tekkis küsimus, kas Fis-i biofilmi moodustumise soodustamine võib olla seotud *lapE* transkriptsiooni võimendamisega. Seega on käesoleva töö teiseks eesmärgiks välja selgitada, kas Fis reguleerib *lapE* geeni ekspressiooni.

## 2. Materjal ja metoodika

### 2.1. Bakterite kasvatamistingimused

Baktereid kasvatati LB (Luria-Bertani sööde) täissöötmes (Miller, 1992), millele tardsöötme saamiseks lisati agarit 16,5 g/l. Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti rakke loksutil 180 pööret minutis. Töös kasutati järgmisi selektsioonimarkereid: gentamütsiin (Gm, 10 µg/ml), streptomütsiin (Sm, 200 µg/ml), kanamütsiin (Km, 50 µg/ml) ja penitsilliin (Pn, 1500 µg/ml). *Tac* promootori indutseerimiseks lisati söötmesse 1 mM lõppkontsentratsiooniga IPTG (isopropüül-β-tioglaktosiid). *Pseudomonas putida* rakke kasvatati temperatuuril 30 °C ja *Escherichia coli* rakke temperatuuril 37 °C. Kasutatud bakterid ja plasmiidid on välja toodud tabelis 3.

**Tabel 3** Töös kasutatud bakterid ja plasmiidid

Bakter	Iseloomustus või genotüüp	Allikas
<i>E. coli</i> BW25113	rrnB3 $\Delta$ lacZ4787 hsdR514 $\Delta$ (araBAD)567 $\Delta$ (rabad)568 rph-1	(Baba jt., 2006)
<i>E. coli</i> BW25113 $\Delta$ fis::Km <sup>R</sup>	BW25113, <i>fis</i> geeni asemel on Km <sup>R</sup> geen	Keio tüvede kogu (Baba jt., 2006)
<i>E. coli</i> BW25113 $\Delta$ fis	BW25113 $\Delta$ fis::Km <sup>R</sup> -i Km <sup>R</sup> geen on FLP rekombinaasiga deleteeritud	Käesolev töö
<i>P. putida</i> PSm	PaW85; <i>glmS</i> geeni järele inserteeritud mini-Tn7- $\Omega$ Sm kassett (Sm <sup>r</sup> )	(Jakovleva jt, 2012)
<i>P. putida</i> PSm $\Delta$ rpoS	PSm tüvest on deleteeritud <i>rpoS</i> geen (PP_1623) vastavalt Victor de Lorenzo protokollile (Martínez-García ja de Lorenzo, 2011)	Annika Teppo avaldamata andmed
<i>P. putida</i> PSm $\Delta$ phoB	PSm tüvest on deleteeritud <i>phoB</i> geen (PP_5320) vastavalt Victor de Lorenzo protokollile (Martínez-García ja de Lorenzo, 2011)	Annika Teppo avaldamata andmed
<i>P. putida</i> F15	PaW85; <i>glmS</i> geeni järele inserteeritud mini-Tn7-term- <i>lacI</i> <sup>q</sup> - <i>Ptac-fis</i> -T1T2- $\Omega$ Gm kassett (Gm <sup>r</sup> )	(Jakoleva jt, 2012)
<b>Plasmiid</b>		
pBLKT	Test-vektor <i>lacZ</i> geeni ja T1T2 terminaatoriga (Km <sup>R</sup> )	(Moor, 2011)
pBLKT-lapE1	<i>Bam</i> HI-ga avatud pBLKT-sse on inserteeritud <i>lapE</i> 105 nt (nukleotiid) pikkune promootorala (Km <sup>R</sup> )	Käesolev töö
pBLKT-lapE1-2	<i>Bam</i> HI-ga avatud pBLKT-sse on inserteeritud <i>lapE</i> 155 nt pikkune promootorala (Km <sup>R</sup> )	Käesolev töö

**Tabel 3 jätk** Töös kasutatud bakterid ja plasmiidid

Plasmiid	Iseloomustus või genotüüp	Allikas
pBLKT-lapE1-2pikk	<i>Bam</i> HI-ga avatud pBLKT-sse on inserteeritud <i>lapE</i> 374 nt pikkune promootorala (Km <sup>R</sup> )	(Moor, 2013)
pBLKT-lapE1-2pikk F2mut	pBLKT-lapE1-2pikk, millel on muteeritud Fis-E2 seondumisjärjestus	Käesolev töö
pBLKT-lapE1-2pikk F3mut	pBLKT-lapEpikk, millel on muteeritud Fis-E3 seondumisjärjestus	Käesolev töö
pBLKT-lapE1-2pikk F2,3mut	pBLKT-lapEpikk, millel on muteeritud Fis-E2 ja Fis-E3 seondumisjärjestused	Käesolev töö
pJBlacItac	<i>tac</i> promootorit sisaldav ekspressiooniplasmiid	(Jakovleva jt., 2012)
pJB-PF	pJBlacItac, mille <i>tac</i> promootori järgi on kloneeritud <i>P. putida</i> <i>fis</i> -i geen	(Jakovleva jt., 2012)
pCP20	Temperatuuri tundlikult replitseeruv, FLP rekombinaasi geeni sisaldav plasmiid (Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> )	(Datsenko ja Wanner, 2000)

## 2.2. PCR (polümeraasi ahelreaktsioon)

PCR-i läbiviimiseks kasutati matriitsina *ca* 1 ng eelnevalt puhastatud DNA-d või otse bakteritest kuumutamisel vabanevat DNA-d. Reaktsiooni segu lõppmahuga 30 µl sisaldas PCR puhvrit (75 mM Tris HCl pH 8,8; 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,01% Tween 20; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM tartrasiin; 0,2 mM dNTP; 0,5% Ficoll 400), 10 pmol-i mõlemat praimerit, 1 U Taq DNA polümeraasi, matriits-DNA-d ja lõppmahuni lisatud mQ vett. Töös kasutatud praimerid on välja toodud tabelis 4. PCR tsükli etapid olid järgmised: 96 °C 3 minutit bakterite lõhkumiseks ja DNA denatureerimiseks, 96 °C 30-60 sekundit DNA denatureerimiseks, 56 °C 30-60 sekundit praimerite kinnitumiseks matriits-DNA-le ja 72 °C olenevalt amplifitseeritava ala pikkusest 30-60 sekundit DNA sünteesiks. Viimast kolme etappi korrati 25 korda.

**Tabel 4** Töös kasutatud praimerid

Praimer	Praimeri järjestus 5' → 3' suunas	Seondumiskoht
enneprtac	GCATAATTCGTGTCGCTCAAG	Vektoril pJBlacItac <i>lacI</i> geeni ja T1T2 terminaatori vahel 257-237 nt-d T1T2 terminaatorist suunaga selle poole
lacZAB	GTGTTACCCAGAGTCAGC	Vektoril pBLKT, 3-20 nt-d <i>lacZ</i> geenis suunaga geeni algusest välja
lapE-II mut**	GGCAATTTGATAGCCCGAAC CCTTCTTACCTAT	114-147 nt-d enne <i>lapE</i> geeni algust suunaga geeni poole
lapE-III mut**	TTGTTGTCTAATGAGTGTGGG TTCAAGGGCACG	158-191 nt-d enne <i>lapE</i> geeni algust suunaga geenist eemale
lapE-I*	AGGATCCGATAAGTTTATCGT CATTTTT	44-64 nt-d enne <i>lapE</i> geeni algust suunaga geeni poole
lapE-FE2-BHI*	TGGATCCGCGTTGAATGTACT TAGCTG	94-114 nt-d enne <i>lapE</i> geeni algust suunaga geeni poole
lapE-fw*	TGGATCCAACCCTGCACAAGC CAAAG	315-333 nt-d enne <i>lapE</i> geeni algust suunaga geeni poole
lapE-rev*	TGGATCCGCCAACAGTAAAG CACTGG	23-41 nt-d geeni algusest suunaga geeni alguse poole
T1T2	TGGCCTTTTTGCGTAGATC	107-125 nt-d <i>lacZ</i> geenist ülesvoolu suunaga geeni alguse poole (pBLKT-s)

\*Allajoonituna on tähistatud restriктаasi *Bam*HI äratundmisjärjestused

\*\*Jämedas kirjas on tähistatud nukleotiidid, mis erinevad matriits ahela järjestusest.

### 2.3. DNA geelelektroforees

DNA geelelektroforeesi kasutati DNA olemasolu kontrollimiseks ja PCR-iga amplifitseeritud fragmendi pikkuste hindamiseks. Elektroforeesiks kasutati 1% agarooosgeeli 1x TAE puhvris (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2), mis sisaldas 0,25 µg/ml etiidiumbromiidi. PCR-i segu või Fermentas foreesivärviga *6X Orange Loading Dye* värvitud DNA kanti geelile kõrvuti Thermo Scientific *Zipruler Express DNA ladder* markeriga. Elektroforees toimus 1x TAE puhvris 125 voldi juures 10-15 minutit. Tulemus visualiseeriti UV valguses.

### 2.4. Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon

*P. putida* rakke kasvatati üleöö 5 ml-is LB söötmes temperatuuril 30 °C koos vastava antibiootikumiga. Rakud tsentrifuugiti kokku (12000 x g, 1 minut) ning pesti kolm korda 1 ml-i 300 mM sahharoosi lahusega. Seejärel võeti rakud üles 400-1000 µl-is 300 mM sahharoosi lahuses.

*E. coli* BW25113 rakke kasvatati üleöö 5 ml-is LB söötmes 37 °C juures koos vastava antibiootikumiga. Seejärel tehti üleöökultuurist 5 ml-i värskesse LB söötmesse 40-kordne lahjendus ja kasvatati temperatuuril 37 °C kuni OD<sub>580</sub> (optiline tihedus) oli 0,4-0,5. *E. coli* kompetentide tegemisel hoiti rakke kogu aeg jääl ja tsentrifuugiti temperatuuril 4 °C. Rakud tsentrifuugiti kokku (3300 x g, 3 minutit) ning pesti kaks korda 1 ml-i 10% glütserooli lahusega ja võeti üles 50 µl-is 10% glütserooli lahuses.

Kompetentsed rakud kasutati koheselt elektroporatsioonil plasmiidse DNA viimiseks bakterirakkudesse. Selleks segati 50 µl kompetentseid rakke 0,3 µl-i plasmiidse DNA-ga (kokku 100 ng DNA-d). Koporeerimisel lisati 50 µl-ile kompetentsetele rakkudele 4 µl-i kumbagi plasmiidset DNA-d. Segu asetati elektroporatsiooniküveti ning plasmiidne DNA elektroporeeriti rakkudesse. Poratsioonil kasutati elektroporaatorit „*E. coli* Pulser“ firmalt Biorad pingel 2500 V. Peale elektroporatsiooni kanti rakud küvetist 1,5 ml LB söötmesse ja kasvatati loksutil 1 tund. Seejärel tsentrifuugiti rakud kokku (12000x g, 1 minut) ja plaaditi selektiivsöötmele.

## 2.5. Promootorala kloneerimine transkriptsioonivektoris

Kloneerimisel kasutati firma Thermo Scientific ensüüme vastavalt tootja protokollile. Kloneerimist kasutati promootorade *lapE1*, *lapE1-2*, *lapE1-2pikk F2mut*, *lapE1-2pikk F3mut* ja *lapE1-2pikk F2,3mut*, viimiseks vektorisse pBLKT.

Promootorade *lapE1* ja *lapE1-2* saamiseks amplifitseeriti *lapE1-2pikk* promootorala PCR-iga. Promootorala *lapE1* saamiseks kasutati praimereid lapE-I (Tabel 4) ja lapE-rev ning *lapE1-2* saamiseks praimereid lapE-FE2-BHI ja lapE-rev. Praimerite otsa olid disainitud restriктаasi BamHI äratundmisjärjestused.

Promootorade *lapE1-2pikk F2mut* (Tabel 3), *lapE1-2pikk F3mut* ja *lapE1-2pikk F2,3mut* saamiseks amplifitseeriti *lapE1-2pikk* promootorala kaheetapilisel PCR-il. *LapE1-2pikk F2mut* saamiseks kasutati esimesel PCR etapil praimereid lapE-II<sub>mut</sub> ja lapE-rev ja teisel etapil praimereid lapE-fw ja eelmisel PCR etapil saadud produkti. *LapE1-2pikk F3mut* saamiseks kasutati esimesel PCR etapil praimereid lapE-III<sub>mut</sub> ja lapE-fw ja teisel etapil kasutati praimeriteks lapE-rev ja eelmisel PCR etapil saadud produkti. Praimerite lapE-fw ja LapE-rev otsa olid disainitud restriктаasi BamHI äratundmisjärjestused. *LapE1-2pikk F2,3mut* saamiseks muteeriti esmalt Fis-E2 seondumisjärjestus ning seejärel Fis-E3 seondumisjärjestus nii nagu eelpool kirjeldatud.

Kloneerimisel lõigati PCR-i produkti ja vektorit *Fast Digest* restriктаasiga BamHI vastavalt tootja protokollile (Thermo Scientific). Kloneerimise efektiivsemaks muutmiseks lisati pBLKT-le aluseline fosfataas FastAP, mis ei lase vektori otstel tagasi kokku kleepuda. DNA ligeerimiseks vektoriga kasutati T4 DNA ligaasi ning reaktsioon toimus 17 °C juures üleöö.

Restriktsooni- ja ligaasisegud sadestati kolmekordse mahu külma 96° etanooliga ja 0,1-kordse mahu 5 M NaCl-i lahusega. Sadestati 10-20 minutit -20 °C juures. Seejärel tsentrifuugiti DNA põhja temperatuuril 4 °C (16100 x g, 10-15 minutit). Sadenenud DNA-d pesti 200 µl-i 80° etanooliga üks kord, tsentrifuugides (16100 x g, 10 minutit) temperatuuril 4 °C. Nii restrikteeritud kui ligeeritud DNA võeti üles 10-20 µl-is mQ vees. Ligeeritud DNA elektroporeeriti *P. putida* PSm rakkudesse.

Konstruktide õigsust kontrolliti sini-valge testiga X-gal-i (5-bromo-4-kloro-3-indool-β-D-galaktopüranosiid) sisaldaval söötmel, PCR-iga ja sekveneerimisega. PCR-il kasutati praimereid lacZAB ning lapE-fw. Sekveneeriti aga praimeritega lacZAB ja T1T2.

## 2.6. B-galaktosidaasi eriaktiivsuse mõõtmine

B-galaktosidaasi eriaktiivsust mõõdeti vastavalt Milleri modifitseeritud meetodikale (Miller, 1972). B-galaktosidaasi eriaktiivsust mõõdeti Milleri ühikutes, mis näitab kollase produkti, orto-nitrofenooli teket rakutiheduse kohta. Rakke kasvatati 18 tundi LB söötmes vastava antibiootikumiga nii IPTG-ga (1 mM lõppkontsentratsiooniga) kui ilma. IPTG juuresolekul toimub *P. putida* F15 tüves Fis-i transkriptsioon *tac* promootorilt. Rakutihedus mõõdeti spektrofotomeetriga 580 nm lainepikkuse juures. Logaritmilise kasvufaasi rakkude  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsuse mõõtmiseks tehti üleöökultuurist lahjendus OD-ga 0,1 kaks tundi ning seejärel lisati IPTG-ga variandile 1 mM lõppkontsentratsiooniga IPTG ja kontrollidele mQ vesi ning inokuleeriti veel kaks tundi. Eriaktiivsuse mõõtmiseks segati reaktsioonisegu, mis sisaldas 800  $\mu$ l Z-puhvrit (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 35 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 28 mM  $\beta$ -merkaptopetanool; pH 7), 50  $\mu$ l kloroformi, 10-50  $\mu$ l bakterikultuuri ja 200  $\mu$ l ONPG-d (orto-nitrofenüül- $\beta$ -D-galaktopüranosiid, kontsentratsiooniga 4 mg/ml). Kollase värvi tekkimisel peatati reaktsioon 500  $\mu$ l 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> lisamisega. Reaktsioonil tekkinud kollase produkti hulk määrati spektrofotomeetriselt 420 nm lainepikkusel ja lüüsitud rakkude tihedus 550 nm lainepikkusel. Eriaktiivsuse arvutamiseks mõõdeti ka reaktsioonიაგ.

B-galaktosidaasi eriaaktiivsus (E) arvutati järgmise valemiga:

$$E = \frac{1000 \times (OD1 - 1,75 \times OD2)}{T \times V \times OD3}$$

T tähistab reaktsioonიაგ minutites, V on bakterikultuuri hulk milliliitrites, OD1 on kollase produkti neeldumine 420 nm lainepikkusel, OD2 on lüüsinud rakkude tihedus 550 nm lainepikkusel ja OD3 on rakutihedus 580 nm lainepikkusel.

## 2.7. DNA sekveneermine

DNA sekveneerimiseks amplifitseeriti uuritavaid proove PCR-iga. PCR-i proove töödeldi 2,5 U ExoI (*Escherichia coli* eksoensüüm I) ja 1 U aluselise fosfataasiga (FastAP) 15 minuti jooksul 37 °C juures ja peatati 15 minuti jooksul 80 °C juures. Seejärel segati kokku reaktsioonisegu lõppmahuga 10  $\mu$ l, mis sisaldas 0,3  $\mu$ l PCR-i produkti, 0,7  $\mu$ l *BigDye Premix*-i, 2  $\mu$ l *BigDye* lahjenduspuhvrit, 1,6 pmol/ml praimerit ja lõppmahuni lisatud mQ vett. Sekveneerimisreaktsioon koosnes järgmistest etappidest: 96 °C 15 sekundit, 56 °C 10 sekundit ja 60 °C 45 sekundit, kõiki etappe korrati 30 korda. Reaktsioonisegu sadestati 10 minuti jooksul 2  $\mu$ l dekstraani ja 30  $\mu$ l 96° etanooliga. Segu pesti kaks korda 200  $\mu$ l 70° etanooliga

tsentrifuugides (13543 x g, 10 minutit) ning võeti üles 10 µl formamiidis. Sekveneerimiseks kasutati TŮMRI sekveneerimisteenust ja saadud DNA järjestusi analüüsiti programmiga BioEdit 7.0.9.1.

## **2.8. DNA eraldamine**

DNA eraldamist kasutati plasmiidse DNA välja puhastamiseks rakkudest. Kasutati 1-3 ml-i üleöö, kuid mitte kauem kui 20 tundi kasvanud, rakukultuuri. Eraldamiseks kasutati Favorgeni *Favorprep Plasmid Extraction Mini Kit*-i vastavalt tootja protokollile. Eraldatud DNA elueeriti 60 µl mQ-ga.

## **2.9. BW25113Δfis::Km<sup>R</sup>-i antibiootikumi resistentsusgeeni elimineerimine**

BW25113Δfis::Km<sup>R</sup> rakke elektroporeeriti pCP20 plasmiga, mis sisaldab FRT järjestustega rekombineeruvat FLP rekombinaasi geeni. Transformeeritud rakke kasvatati 1,5 ml-is LB vedelsöötmes eksponentsiaalse kasvufaasini. Seejärel hoiti rakke üks tund 43 °C juures rekombinaasi geeniekspressiooni aktiveerimiseks. Rakud külvati paralleelselt ampitsilliini ja kanamütsiini sisaldavatele söötmetele. Kui rakud kasvasid vaid ampitsilliini sisaldaval söötmel, oli rekombinatsioon toimunud ning kanamütsiini resistentsusgeen elimineerinud. Plasmiidist pCP20 lahti saamiseks kasvatati rakke üleöö antibiootikumita LB vedelsöötmes ning plaaditi LB agarile. Seejärel külvati rakud paralleelselt antibiootikumita ja ampitsilliini sisaldavatele LB söötmele, et kontrollida antibiootikumi resistentsuse kadumist rakkudest.

## **2.10. Statistiline analüüs**

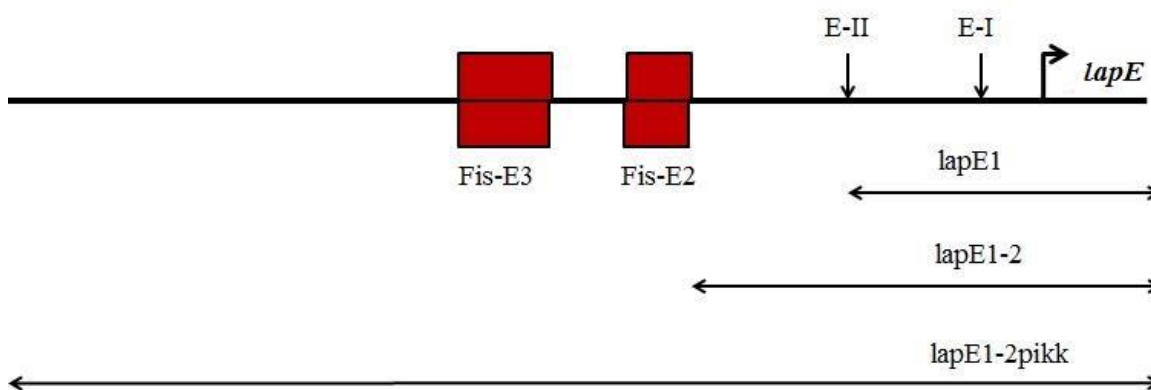
Statistiliseks analüüsiks kasutati paketti Statistica 13. Tulemusi analüüsiti multifaktoriaalse ANOVA-ga usaldusnivool 0,05. P-väärtused arvutati Bonferroni testiga programmis PostHoc. Joonistel on näidatud mõõtmistulemuste keskvärtused koos 95% usalduspiiridega ning homogeensusrühmadega.



### 3. Tulemused

#### 3.1. Saadud konstruktid

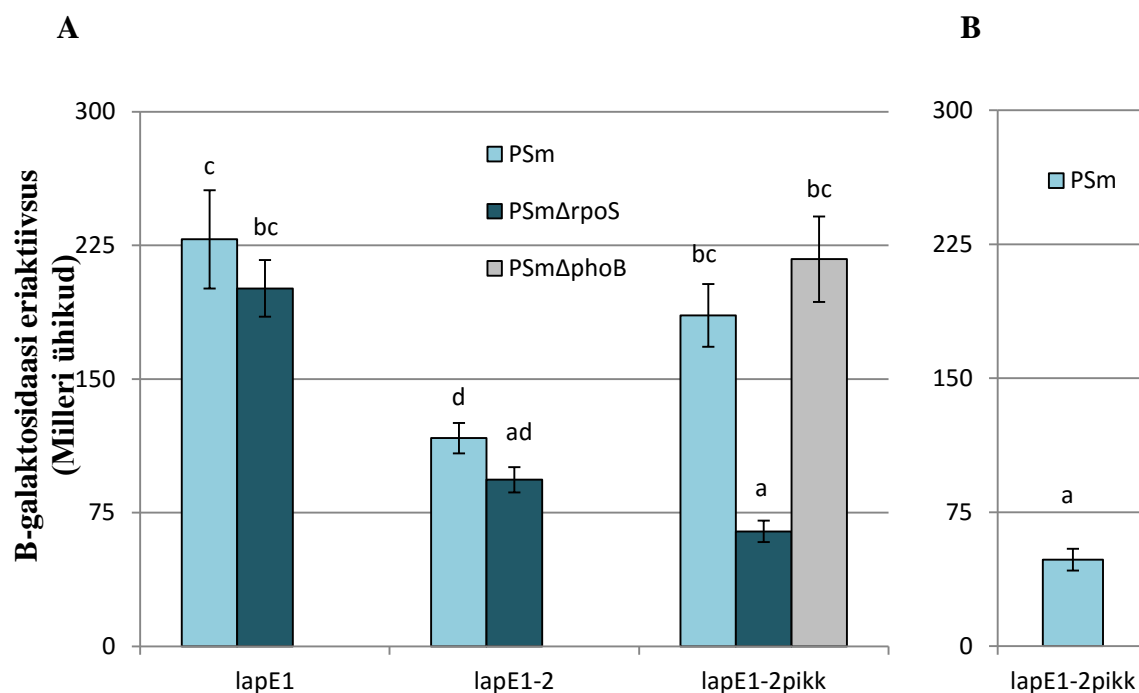
Kloneeriti 105 nt pikkust *lapE* promootorala fragmenti sisaldav konstruktt pBLKT-*lapE*1, 155 nt pikkuse *lapE* promootorala fragmendiga konstruktt pBLKT-*lapE*1-2 ning 374 nt pikkust *lapE* promootorala fragmenti sisaldavad konstruktid pBLKT-*lapE*1-2pikk F2mut, pBLKT-*lapE*1-2pikk F3mut ja pBLKT-*lapE*1-2pikk F2,3mut ning kasutati eelnevalt olemas olnud konstruktti pBLKT-*lapE*1-2pikk (Joonis 2, Tabel 3).



**Joonis 2.** Erineva pikkusega *lapE* promootorala koos RACE-iga määratud mRNA 5' otsadega ning Fis-i seondumiskohtadega. Nooltega on märgitud ennustatud 5' mRNA otsad, kõvernoolega geeni algus ning punaste kastidega Fis-i seondumisjärjestused. Kaheotsaliste nooltega on näidatud *lapE* promootorala fragmendid, mis on vektorisse pBLKT kloneeritud.

#### 3.2. Geeni *lapE* promootorid

Urimaks *lapE* geeni transkriptsioonilist regulatsiooni, tuli esmalt leida, mitu promootorit *lapE* geenil on. Meie laboris oli eelnevalt RACE meetodil lokaliseeritud kaks *lapE* mRNA 5' otsa, E-I ja E-II, mis asuvad vastavalt 16 nukleotiidi ja 65 nukleotiidi ülesvoolu *lapE* geeni algusest (Riho Teras avaldamata andmed). Leitud mRNA 5' otsad viitavad transkriptsiooni alguskohale. Transkriptsiooni hindamiseks kasutati *lacZ* geenil põhinevat testvektorit pBLKT. Testgeeni ette kloneeriti erineva pikkusega *lapE* promootorala fragmendid ning transkriptsiooni regulatsiooni hinnati  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsuse järgi (Joonis 3 A). Konstruktt pBLKT-*lapE*1 (Joonis 2) sisaldab ühte potentsiaalset promootorit, pBLKT-*lapE*1-2 kahte potentsiaalset promootorit ning pBLKT-*lapE*1-2pikk kogu uuritavat promootorala.



**Joonis 3.** Erineva pikkusega *lapE* promootoralade  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus *P. putida* LB vedelsöötmes kasvanud rakkudes. Joonisel on näidatud mõõtmistulemuste keskvväärtused koos 95% usalduspiiridega ning homogeensusrühmadega. **A** B-galaktosidaasi eriaktiivsus *P. putida* tüvede PSm, PSmΔrpoS ja PSmΔphoB statsionaarse faasi rakkudes. Toodud on vähemalt 5 paralleeli keskmised tulemused. **B** B-galaktosidaasi eriaktiivsus *P. putida* tüve PSm logaritmilise faasi rakkudes. Töödud on 10 paralleeli keskmised tulemused.

PSm tüves mõõdetud konstrukti pBLKT-lapE1  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus (Joonis 3 A) on märgatavalt kõrgem kui promootorita pBLKT basaalne eriaktiivsus, milleks on 0,9 Milleri ühikut. (Lahesaare jt., 2014). Selline tulemus kinnitab, et *lapE* mRNA 5' otsast E-I ülesvoolu on promootor.

Konstrukti pBLKT-lapE1-2  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus on aga umbes kaks korda väiksem kui konstruktil pBLKT-lapE1 ( $P < 0,0001$ ). Selline tulemus viitab küll transkriptsiooni langusele, kui *lapE* promootorala konstruktis pBLKT-lapE1 5' otsast pikendada, kuid pole võimatu, et ka see DNA lõik sisaldab promootrit, sest selles piirkonnas asub *lapE* geenist kaugeim mRNA 5' ots. B-galaktosidaasi eriaktiivsuse langus tuleneb arvatavasti repressori seondumisest antud DNA alale.

Konstrukti pBLKT-lapE1-2pikk  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus on, võrreldes konstruktiga pBLKT-lapE1-2, 1,6 korda kõrgem ( $P < 0,0001$ ). Lisandunud ala võib sisaldada veel ühte promootorit, kuid selles piirkonnas ei ole mRNA 5' otsa tuvastatud. Seega on tõenäolisem, et antud piirkonda lisandub *lapE* transkriptsiooni aktivaatori seondumisjärjestus.

Geeni *lapE* promootorala piirkonnas, mis sisaldab ühte potentsiaalset promootorit, on olemas promootor, millelt toimub *lapE* geeni transkriptsioon. Kui antud promootorala pikendada 5' suunas, siis võib lisanduda veel üks promootor, kuid kindlasti lisandub mingi repressori seondumisjärjestus. Kui pikendada *lapE* promootorala, mis sisaldab kahte potentsiaalset promootorit, veelgi 5' suunas, tõuseb  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus, mis võib viidata veel ühe promootori või aktivaatori lisandumisele *lapE* promootorala piirkonda, mille võrra promootorala pikendati.

### 3.3. Geeni *lapE* avaldumine logaritmilises kasvufaasis

Uurimaks, kas *lapE* transkriptsioon toimub kasvufaasiti erineva kiirusega, mõõdeti pBLKT-*lapE*1-2pikk konstrukti  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus logaritmilise kasvufaasi PSm tüve rakkudes (Joonis 3 B).

Geeni *lapE* promootor on aktiivne ka logaritmilises kasvufaasis, kuid konstrukti pBLKT-*lapE*1-2pikk  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus on umbes neli korda madalam, kui statsionaarses kasvufaasis mõõdetud  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus PSm rakkudes (Joonis 3;  $P < 0,0001$ ).

### 3.4. RpoS-i mõju *lapE* avaldumisele *P. putida*'s

Kuna eelmisest katsest ilmnes, et *lapE* transkriptsiooni tase on statsionaarses faasis kõrgem kui logaritmilises, siis tekkis küsimus, kas *lapE* avaldumine võib olla statsionaarse faasi  $\sigma$ -faktorist RpoS sõltuv.

Mõõdeti pBLKT-*lapE*1, pBLKT-*lapE*1-2 ja pBLKT-*lapE*1-2pikk konstruktide  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus *P. putida* tüvedes PSm ja PSm $\Delta$ rpoS (joonis 3 A).

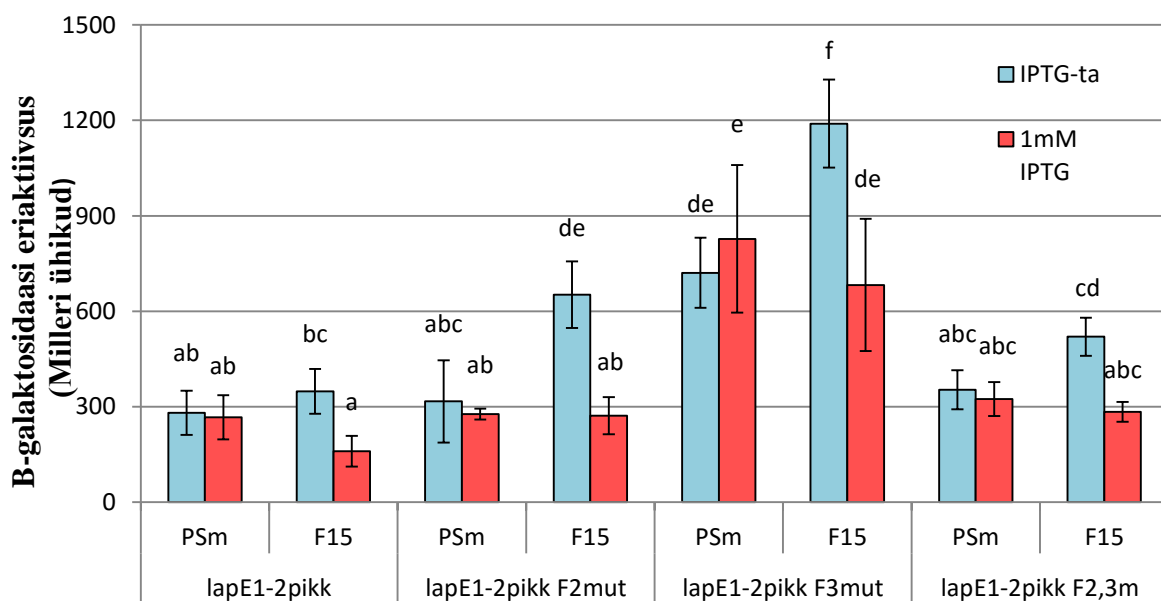
Täispikka promootorala sisaldava konstrukti  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus on metsiktüves umbes kolm korda kõrgem kui *rpoS* deletsioonitüves ( $P < 0,0001$ ). Samas mõlemat lühemat promootorala fragmenti sisaldavas konstruktis on  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus metsiktüves ja *rpoS* deletsioonitüves samal tasemel ( $P = 1$ ). Seega ei ole eelnevalt kirjeldatud promootorid, mis asuvad E-I või E-II mRNA 5' otsa ees, RpoS-st sõltuvad.

RpoS-ist sõltuvat regulatsiooni on näha vaid juhul, kui konstrukti sisaldab täispikka *lapE* promootorala, mis sisaldab nii Fis-i seondumisjärjestusi kui ka mõlemat potentsiaalset promootorit. Sellest lähtuvalt võib olla võimalik, et *lapE* promootoril piirkonnas, mida lühemates konstruktid ei ole, asub mingi RpoS-ist sõltuva regulaatori seondumisjärjestus.

### 3.5. Fis-i mõju *lapE* avaldumisele *P. putida*'s

Meie laboris on eelnevalt näidatud, et Fis soodustab *P. putida* biofilmi moodustumist (Jakovleva jt., 2012) ning suurendab LapA hulka rakus (Moor jt., 2014). Sellest tekkis küsimus, kas Fis võib soodustada biofilmi teket *lapE* transkriptsiooni aktivatsiooni kaudu. Kui LapE-d ehk ühte transporterite komponenti on rakus rohkem, siis võib ka transportereid raku membraanis rohkem olla. See aga soodustab suurema hulga LapA transporti raku pinnale ning seeläbi võib soodustada biofilmi moodustumist.

Selleks mõõdeti  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus PSm-i ja F15-e konstruktidel pBLKT-*lapE1-2pikk*, pBLKT-*lapE1-2pikk F2mut*, pBLKT-*lapE1-2pikk F3mut* ja pBLKT-*lapE1-2pikk F2,3mut* (Joonis 4). Neist esimene sisaldab metsiktüüpi *lapE* promootorala, teisel on muteeritud Fis-E2 seondumisjärjestus, kolmandal Fis-E3 seondumisjärjestus ning neljandal mõlemad Fis-i seondumisjärjestused. Muteeritud seondumisjärjestustega Fis ei seonu (Andrio Lahesaare avaldamata andmed).



**Joonis 4.** Metsiktüüpi ja muteeritud *lapE* promootoralaade  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus PSm ja F15 statsionaarse faasi rakkudes kasvatatuna LB söötmes koos 1 mM IPTG-ga või ilma. IPTG juuresolekul toimub F15 tüves Fis-i transkriptsioon *tac* promootorilt. Joonisel on näidatud 9 paralleelse mõõtmistulemuse keskväärtused koos 95% usalduspiiridega ning homogeensusrühmadega.

IPTG lisamine ei mõjuta PSm-is mõõdetud konstruktidel  $\beta$ -galaktosidaasi väärtusi, mis näitab, et IPTG-l ei ole rakkudele iseseisvat mõju ( $P = 1$ ).

IPTG lisamisel F15 rakkudele langeb konstruktide pBLKT-lapE1-2pikk, pBLKT-lapE1-2pikk F2mut ning pBLKT-lapE1-2pikk F3mut  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus, võrreldes IPTG-ta kasvanud rakkudega, umbes kaks korda ( $P < 0,05$ ). Ka tüve F15 konstrukti pBLKT-lapE1-2pikk F2,3mut  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus langeb 1,8 korda kui rakke kasvatada IPTG juuresolekul, kuid antud juhul on P-väärtuseks 0,053, mis näitab, et erinevus ei ole statistiliselt oluline. Samas on P-väärtus piiripealne, mistõttu erinevust IPTG-ta ja IPTG-ga kasvanud rakkude vahel välistada ei saa. Nähtavasti repressseerib Fis-i üleekspresseerimine F15 tüves *lapE* transkriptsiooni, kuid mõlema Fis-i seondumisjärjestuse muteerimisel repressioon siiski säilib. See viidatab aga kaudsele regulatsioonile.

Kuigi IPTG lisamine F15 rakkudele langetas  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsust võrreldes IPTG juuresolekul kasvanud F15 rakkudega, siis  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus ei lange madalamale kui PSm rakkudes mõõdetud  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus.  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus PSm rakkudes ja IPTG juuresolekul kasvanud F15 rakkudes on samal tasemel ( $P = 1$ ).

$\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus kõikidel pBLKT-lapE1-2pikk F3mut konstruktidel on kõrgem, võrreldes vastavate rakkudega, mis sisaldavad metsiktüüpi promootorala ( $P < 0,0001$ ), Fis-E2 muteeritud seondumisjärjestust ( $P < 0,0001$ ) või mõlemat muteeritud Fis-i seondumisjärjestust ( $P < 0,0001$ ).

Fis võib arvatavasti *lapE* transkriptsiooni repressseerida. Repressioon säilib aga ka siis, kui mõlemad Fis-i seondumisjärjestused muteerida, kuigi antud juhul  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsuse langus statistiliselt oluline ei ole.

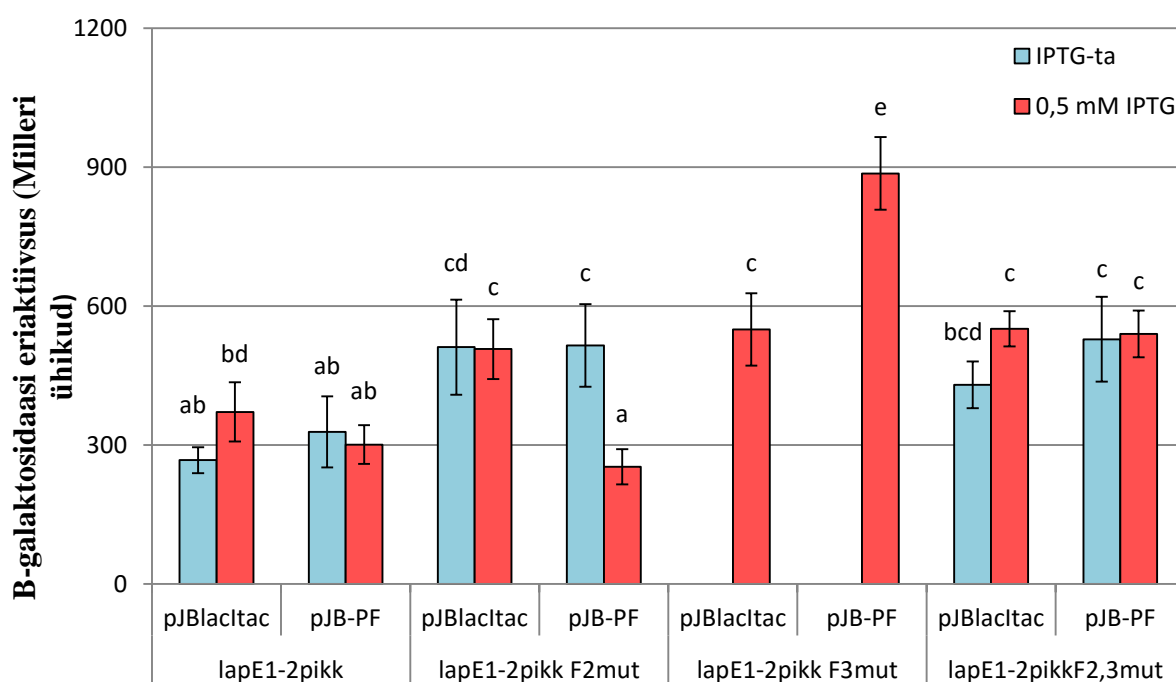
Selleks, et paremini mõista Fis-i mõju *lapE* avaldumisele, tuleks luua süsteem, kus rakus Fis-i ei oleks. *P. putida*'s ei ole võimalik *fis* deletsioonitüve luua, sest *fis* geeni deleteerimine on rakkudele letaalne (Jakovleva jt., 2012).

### 3.6. Fis-i mõju *lapE* avaldumisele *E. coli*'s

Selleks, et luua rakkudes *P. putida* *fis*-i vaba testsüsteem, otsustati vaadelda Fis-i mõju *lapE* avaldumisele *Escherichia coli*'s. *E. coli*'s ei ole *fis* geeni deleteerimine rakkudele letaalne (Schneider jt., 1997). Lisaks ei mõjuta *E. coli*'s tulemusi ka *P. putida* liigispetsiifilised regulatsioonisüsteemid.

Mõõdeti *E. coli* tüve BW25113 $\Delta$ fis konstruktide  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus, et hinnata *lapE* transkriptsiooni sõltuvust *P. putida* Fis-ist (Joonis 5). Rakke kasvatati nii 0,5 mM IPTG juuresolekul kui ka IPTG-ta.

Fis-i efekti uurimiseks kasutati plasmidi pJB-PF, millelt on võimalik IPTG lisamisel *P. putida* Fis-i ekspresseerida ning negatiivse kontrollina tühja plasmidi pJBlacItac. Lisaks pJBlacItac või pJB-PF plasmidile viidi BW25113 $\Delta$ fis rakkudesse ka üks järgmistest plasmiididest: pBLKT-*lapE*1-2pikk, pBLKT-*lapE*1-2pikk F2mut, pBLKT-*lapE*1-2pikk F3mut või pBLKT-*lapE*1-2pikk F2,3mut.



**Joonis 5.** B-galaktosidaasi eriaktiivsus *E. coli* BW25113 $\Delta$ fis statsionaarse faasi rakkudel, kasvanud LB söötmes koos 0,5 mM IPTG-ga või IPTG-ta. Joonisel on näidatud vähemalt 6 paralleelse mõõtmistulemuse keskvärtused koos 95% usalduspiiridega ning homogeensusrühmadega.

Metsiktüüpi *lapE* promootoralaga konstruktid, mis ei ole kasvanud IPTG juuresolekul, ning, mis sisaldavad tühja pJBlacItac plasmidi, on näha sarnast  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsust ( $P > 0,5$ ). Samuti on sarnane  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus muteeritud *lapE* promootorala sisaldavatel konstruktidel, mis on kasvanud IPTG-ta ning sisaldavad tühja pJBlacItac plasmidi. Näib, et *P. putida* Fis-i ekspressiooni IPTG-ga võimendamata, ei reguleerita *lapE* transkriptsiooni ( $P > 0,5$ ).

Metsiktüüpi *lapE* promootorala  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus koos pJBlacItac ning pJB-PF plasmiididega on IPTG-ga kasvanud rakkudel sama kõrge ( $P = 1$ ).

Fis-E2 seondumisjärjestuse muteerimisel, kus Fis saab seonduda vaid Fis-E3 seondumisjärjestusega on näha Fis-i juuresolekul  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsuse kahekordset langust ( $P < 0,0001$ ), samas püsib konstruktide eriaktiivsus samal tasemel kui rakke on kasvatatud IPTG-ta ( $P = 1$ ).

Fis-E3 seondumisjärjestuse muteerimisel, kus Fis saab seonduda vaid Fis-E2 seondumisjärjestusega on näha Fis-i juuresolekul  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsuse 1,6-kordset tõusu ( $P < 0,0001$ ).

Mõlema Fis-i seondumisjärjestuse muteerimisel on  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus samal tasemel Fis-i komplementatsiooniplasmiidi ja tühja plasmiidi sisaldavates konstruktidest ( $P = 1$ ) ning ei erine ka IPTG juuresolekul kasvanud rakkudes ja IPTG-ta kasvanud rakkudes ( $P > 0,5$ ). Kui Fis ei saa enam Fis-E2-le ega Fis-E3-le seonduda, ei võimenda ega pärsi Fis-i ekspressioon  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsust. See näidatab, et kui regulaator Fis ei saa promootoralaga seonduda, ei toimu ka regulatsiooni.

Fis-E2 seondumisjärjestuse kaudu toimub arvatavasti aktivatsioon, Fis-E3 seondumisjärjestuse kaudu toimub repressioon. Kui mõlemad Fis-i seondumisjärjestused on aktiivsed ja regulatsioon käib mõlema seondumisjärjestuse kaudu jääb  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus samale tasemele. Mõlema Fis-i seondumisjärjestuse muteerimisel ei ole samuti regulatsiooni näha. Regulatsiooni ei ole näha ka juhul kui rakud ei tooda Fis-i.

### 3.7. PhoB mõju *lapE* avaldumisele *P. putida*'s

Meie laboris on eelnevalt *in silico* ennustatud, et *lapE* promootoralal on geeni algusest ülesvoolu kaks PhoB seondumisjärjestus (Riho Teras avaldamata andmed). Sellest tulenevalt taheti näha, kas PhoB reguleerib *lapE* transkriptsiooni. Selleks mõõdeti pBLKT-*lapE*1-2pikk konstrukti  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus *P. putida* tüve PSm $\Delta$ phoB statsionaarse faasi rakkudes (Joonis 3 A).

Konstrukti  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus *phoB* deletsioonitüves ei erine metsiktüves mõõdetud konstrukti  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsusest ( $P > 0,05$ ). Sellise tulemuse põhjal võib arvata, et PhoB ei reguleeri vähemalt antud tingimustes *lapE* transkriptsiooni.

## 4. Arutelu

*Pseudomonas putida* võime kasutada energia omastamiseks väga erinevaid süsinikuallikaid on muutnud selle väga oluliseks uurimisobjektiks (Nelson jt., 2002). Lisaks on *P. putida* oluline, sest suudab taime juuri koloniseerides soodustada taime kasvu, konkureerides välja taimepatogeene (Weller, 1988). Sellises konkurentsisis on bakterile oluline just biofilmi moodustumine, mis võimaldab stabiilselt juurtele kinnituda ja ebasoodsates keskkonnatingimustes toime tulla (Hoiby jt., 2010). *P. putida* biofilmi moodustamiseks on vajalik kleepvalk LapA, mille abil bakter suudab pinnale kinnituda. Samas biofilmi moodustumine ja LapA hulk raku pinnal sõltuvad ka mitmetest muudest faktoritest ning regulatsioonisüsteemidest. Üheks selliseks raku pinnale kantava LapA hulga kontrollpunktiks on selle transporter LapEBC. Kusjuures LapE on selles transporteris eksportvalk, mis vastutab LapA rakust välja transportimise eest. (Hinsa jt., 2003) Seega võiks arvata, et kui LapE-d kui transportervalgu on rakus rohkem, siis transporditakse LapA suurema tõenäosusega raku pinnale, mis soodustab *P. putida* biofilmi teket. Sellest tekkis küsimus, kas ja kuidas biofilmi moodustumist *lapE* kaudu reguleeritakse. Selleks uuriti käesolevas töös *lapE* transkriptsioonilist regulatsiooni.

Esmalt vaadeldi, mitu promootorit *lapE* geenil on. Vaatamaks, kas eelnevalt lokaliseeritud kahest mRNA 5' otsast ülesvoolu on promootorid, mõõdeti  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus erineva pikkusega *lapE* promootorala sisaldavates konstruktidest (Joonis 3.A). Leiti, et geenile kõige lähema, E-I, mRNA 5' otsa ees asub promootor. B-galaktosidaasi eriaktiivsus langes, kui promootorala fragmenti pikendati 5' suunas ning fragmendile lisandus geenist kaugem, E-II, mRNA 5' ots. Samas kuna seal siiski on mRNA 5' ots, siis ei saa välistada, et E-II mRNA 5' otsa ette promootorit ei lisandu. Mõõdetud  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsuse langust saab tõlgendada repressori seondumisega piirkonda, mille võrra lühimat promootorala fragmenti pikendati. Seega lisandub, kas ainult repressor või ka lisaks promootor, millelt toimuvat transkriptsiooni repressor varjab. On võimalik, et kindlatel keskkonna tingimustel, kui repressor on avaldunud ning seondub promootoralaga, siis takistatakse vähemalt ühelt promootorilt toimuvat transkriptsiooni, mille tulemusel *lapE* geeni ekspresseeritakse vähem.

Mõõtes aga  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsust täispika *lapE* promootoralaga konstruktis, oli näha eriaktiivsuse tõusu, võrreldes konstruktiga, milles oli keskmise pikkusega *lapE* promootorala fragment. Antud tulemustest lähtuvalt ei saa välistada, et piirkonda, mille võrra keskmise pikkusega fragmenti pikendati, lisandub ka kolmas promootor. Samas ei ole antud piirkonnas tuvastatud mRNA 5' otsa ning seepärast on kolmanda promootori lisandumine



ebatõenäoline. Selle kontrollimiseks tuleb mõõta ka  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus konstruktis, mis sisaldab promootorala piirkonda, mille võrra keskmise pikkusega fragmenti pikendati. Tõenäolisemalt seondub antud piirkonda aktivaator, mis soodustab transkriptsiooni DNA ahelal allavoolu asuvalt promootorilt. Seega leiti antud katsest, et korraga seonduvad *lapE* promootoralaga nii repressor kui ka aktivaator. Geeni *lapE* transkriptsiooni regulatsioon on keeruline ning võib sõltuda erinevatest regulaatoritest ja regulatsioonisüsteemidest. Antud juhul takistab repressor promootorilt transkriptsiooni, kuid samal ajal aktivaator soodustab seda. Ilmselt seondub mõne keskkonna tingimuse korral suurema afiinsusega aktivaator ning teistel tingimustel repressor.

Regulaatorvalkudest keskenduti käesolevas töös põhiliselt globaalsele transkriptsioonilisele regulaatorile Fis-ile. Eelnevalt oli kirjandusest teada, et Fis soodustab *P. putida* biofilmi moodustumist (Jakovleva jt., 2012). Samuti on eelnevalt *in vitro* näidatud *lapE* promootoralas kaks Fis-i seondumisjärjestust (Lisa 1, Andrio Lahesaare avaldamata andmed). Sellest tekkis ka küsimus, kas Fis võiks olla üks *lapE* transkriptsiooni regulaatoritest. Vastuse saamiseks võrreldi  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsust *P. putida* metsiktüves ja Fis-i üleekspressiooni tüves (Joonis 4). Tulemustest oli regulatsiooni näha, kuid selget vastust esitatud küsimusele ei olnud võimalik saada. Fis-i üleekspressiooni korral oli näha F15-s  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsuse langust, mis viitab, et Fis võib olla *lapE* transkriptsiooni repressor. Samas oli repressiooni näha ka juhul, kui mõlemad Fis-i seondumisjärjestused olid muteeritud, mis viitab Fis-i kaudsele mõjule. Täpsemaks Fis-i mõju selgitamiseks mõõdeti *lapE* promootorala eriaktiivsust *Escherichia coli*'s, sest *E. coli*'s oli võimalik katse läbi viia *fis* deletsioonitüves ning samuti ei mõjutanud tulemusi teised *P. putida* regulatsioonisüsteemid.

*E. coli*'s mõõdetud tulemustest selgus, et Fis-E2 seondumisjärjestuse kaudu aktiveerib Fis *lapE* transkriptsiooni, kuid Fis-E3 seondumisjärjestuse kaudu toimub repressioon (Joonis 5). Samas võib Andrio Lahesaare DNAas I jalajälje tulemuse (Andrio Lahesaare avaldamata andmed, Lisa 1) põhjal arvata, et Fis-E2 seondumisjärjestusele seondub Fis väiksema afiinsusega kui Fis-E3 järjestusele. Seega, kui keskkonnas on Fis-i vähem, võib see esmalt seonduda Fis-i suhtes suurema afiinsusega Fis-E3 järjestusega ning *lapE* transkriptsiooni repressioneerida. Kirjanduses on ka näidatud, et *P. aeruginosa*'l on *fis*-i mRNA hulk biofilmi moodustavates rakkudes madalam kui planktiliselt olevates rakkudes (Waite jt., 2006). Seega kui rakud on moodustanud biofilmi, siis on Fis-i hulk madal ning *lapE* transkriptsiooni repressioneeritakse Fis-E3 seondumisjärjestuse kaudu. Nii jääb transporterit raku membraani vähem ning raku pinnale jõuab vähem LapA-d, millega pärsitakse biofilmi edasist

moodustumist. Kui aga rakud on keskkonnas vabalt ning neis on rohkem Fis-i, siis võib see seonduda ka Fis-E2 seondumisjärjestusele, mille kaudu *lapE* transkriptsiooni aktiveeritakse. Seega võib Fis reguleerida *lapE* transkriptsiooni taset ning sellega ka biofilmi moodustumist oma kontsentratsiooni kaudu, represseerides madalal kontsentratsioonil ja aktiveerides kõrgel Fis-i kontsentratsioonil, taastades nii algse taseme.

Geeni ekspressiooni võib transkriptsiooniliselt reguleerida ka mõni  $\sigma$ -faktor. Mõõtes *lapE* transkriptsiooni taseme sõltuvust kasvufaasist, selgus, et statsionaarses faasis avaldub *lapE* suuremal hulgal kui logaritmilises kasvufaasis (Joonis 3). Sellest tekkis küsimus, kas *lapE* transkriptsioon võib olla sõltuv statsionaarse faasi  $\sigma$ -faktorist RpoS. Tulemustest ilmnes, et *lapE1* ja *lapE1-2* promootorala fragmenti sisaldavate konstruktide transkriptsiooni RpoS ei reguleeri (Joonis 3 A). See näitab, et kumbki promootor ei ole RpoS sõltuv. Samas, kui konstrukti sisaldas täispikka promootorala, langes  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus *rpoS* deletsioonitüves, võrreldes metsiktüvega. Arvatavasti seondub täispikka promootorala piirkonda, mida kummaski lühemas promootorala fragmendis pole, mingi regulaator, mille transkriptsioon on RpoS-ist sõltuv. Kui rakk on statsionaarses faasis ning transkriptsioon toimub RpoS-ist sõltuvalt, siis transkribeeritakse ka antud regulaator, mis seondub *lapE* promootorale ning aktiveerib transkriptsiooni. Sellega moodustub ka rohkem transporterit rakumembraanil ning raku pinnale viiakse suuremas hulgas LapA-d, millega soodustatakse biofilmi teket. Samas kui rakk ei kasuta transkriptsiooni initsieerimiseks RpoS-i, näiteks logaritmilises kasvufaasis või kui *rpoS* geen on deleteeritud, siis antud regulaatorit ei transkribeerita ja see ei saa *lapE* promootorale seonduda. Sellises olukorras ei aktiveerita ka *lapE* geeni ekspressiooni ning transkriptsiooni aktiivsus võrreldes metsiktüvega langeb.

Täispikka promootorala transkriptsiooni aktiivsuse langus *rpoS* deletsioonitüves võib olla põhjustatud ka sellest, et piirkonnas, mida lühemates promootorala fragmentides ei ole, on ka kolmas promootor, millelt toimuv transkriptsioon on RpoS-st sõltuv. Samas aga ei ole antud piirkonnas lokaliseeritud mRNA 5' otsa ning seetõttu on tõenäolisem, et transkriptsiooni aktivatsiooni langus on põhjustatud mingi lisaregulaatori seondumisest.

Eelnevalt on meie laboris näidatud, et *lapE* promootorala piirkonnas, mille võrra on täispikk promootorala lühematest konstruktidest pikem, asub PhoB seondumisjärjestus (Tabel 1, Riho Teras avaldamata andmed). Lisaks on teada eelnevalt kirjandusest, et LapA posttranslatsiooniline regulatsioon on anorgaanilise fosfori kontsentratsioonist sõltuv. Nimelt transkribeeritakse fosfori vaeguses Pho regulonilt RapA, mis lõikab LapA N-terminaalset otsa ning vabastab LapA raku pinnalt. Seega pärsib madal anorgaanilise fosfori kontsentratsioon biofilmi moodustumist. (Monds jt., 2007, Newell jt., 2009) Tekkis küsimus, kas PhoB võib ka

LapE hulka rakus reguleerida. Selle välja selgitamiseks mõõdeti  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus *P. putida* tüves, milles on *phoB* geen deleteeritud ning võrreldi seda metsiktüves mõõdetud  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsusega (Joonis 3 A). Tulemusest selgus, et  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsused on mõlema tüve korral sarnasel tasemel. Samas on  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsus mõõdetud rakkudes, mis on kasvanud LB söötmes, kus on anorgaanilist fosforit piisavalt. Kirjandusest on aga teada, et PhoB on aktiveeritud vaid anorgaanilise fosfori vaeguses (Makino jt., 1989). Seega on võimalik, et *phoB* deletsioonitüve füsioloogia ei erine metsiktüvest, sest viimases pole PhoB piisavalt kõrge anorgaanilise fosfori kontsentratsiooni tõttu aktiveeritud. Selleks, et leida, kas *lapE* transkriptsioon on PhoB-st sõltuv, tuleb mõõta antud konstruktide  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsused rakkudes, mis on kasvanud fosforivaeses söötmes. Eelnevalt on Monds jt. samuti vaadelnud *lapE* transkriptsiooni sõltuvust PhoB-st. Nemad leidsid, et PhoB represserib *lapE* transkriptsiooni, kuid siiski ilmnas, et biofilmi moodustumise langus madala anorgaanilise fosfori kontsentratsiooni korral ei ole tingitud *lapE* transkriptsiooni repressioonist (Monds jt., 2007).

Kokkuvõtvalt toimub *lapE* geeni transkriptsioon vähemalt ühelt promootorilt, mis ei ole RpoS-ist sõltuv. Geeni *lapE* transkriptsiooni reguleerib aga globaalne transkriptsiooni regulaator Fis, millel on *lapE* promootoralas kaks seondumisjärjestust. Ilmselt reguleerib Fis *lapE* transkriptsiooni kontsentratsioonist sõltuvalt, sest Fis-i seondumisjärjestuste kaudu toimub vastupidine regulatsioon, Fis-E2 kaudu aktivatsioon ning Fis-E3 kaudu repressioon. Lisaks Fis-ile reguleerib *lapE* avaldumist mingi repressor, mis ilmselt seondub *lapE* promootoralaga positsioonide vahemikus 106 kuni 155 nukleotiidi geeni algusest ülesvoolu. Veel reguleerib *lapE* transkriptsiooni mingi aktivaator, mille avaldumine on RpoS-st sõltuv.

## Kokkuvõte

Biofilmi moodustamine on *P. putida*-le vajalik taime juurtele kinnitumiseks ning seetõttu bakterile ääretult oluline protsess. Sellepärast on biofilmi moodustumine reguleeritud mitmeid radu pidi. Eelnevalt on põhjalikult uuritud biofilmi moodustumise regulatsiooni LapA posttranslatsioonilise regulatsiooni kaudu. Biofilmi moodustumise regulatsioonist LapA transportervalkude LapE, LapB ja LapC kaudu on aga oluliselt vähem teada.

Käesolevas töös uuriti LapA transportervalgu LapE geeni transkriptsioonilist regulatsiooni. Vaadeldi, milliste promootorite kaudu transkriptsiooniline regulatsioon toimub ning millised regulaatorid seda mõjutavad. Saadud tulemused võib kokku võtta järgmiselt:

- Geeni *lapE* ees võib olla mitu promootorit. Kindlalt võib väita, et transkriptsioon toimub geenile kõige lähema tuvastatud mRNA 5' otsa ees olevalt promootorilt, kuid tõenäoliselt on promootor ka geenist kaugeima tuvastatud mRNA 5' otsa ees. On võimalik, et *lapE* geeni ees asub ka kolmas promootor, kuid käesoleva töö põhjal seda kindlalt väita ei saa.
- Geeni *lapE* transkriptsioon on statsionaarses kasvufaasis tunduvalt aktiivsem kui logaritmilises faasis.
- Lokaliseeritud mRNA 5' otsade ees asuvad promootorid ei ole RpoS-sõltuvad.
- Geeni *lapE* promootoralale, tuvastatud promootoritest ülesvoolu, võib seonduda mingi regulaatorvalk, mille transkriptsioon on RpoS-ist sõltuv.
- Globaalne transkriptsiooni regulaator Fis paistab *P. putida*'s *lapE* transkriptsiooni kaudselt reguleerivat, kuid samas pole *P. putida*'s võimalik hinnata *lapE* transkriptsiooni süsteemis, kus puudub Fis.
- *E. coli* *fis*-i deletsioonitüves tehtud katsed viitavad, et Fis reguleerib *lapE* transkriptsiooni ilmselt kontsentratsioonist sõltuvalt. Kui Fis-i kontsentratsioon on madal, siis seondub see Fis-E3 seondumisjärjestusega, põhjustades repressiooni. Kõrge Fis-i kontsentratsiooni korral seondub see lisaks ka Fis-E2 seondumisjärjestusega, aktiveerides *lapE* transkriptsiooni ning taastades transkriptsiooni algse taseme.

# The effects of global regulators on the transcription of *P. putida*'s transporter gene *lapE*

Johana Koppel

## Summary

*Pseudomonas putida*, generally known as an unpretentious bacterium, prefers to colonize plant roots. It forms biofilm on the roots of many crop plants, which protects them from pathogens and promotes plant growth. Cell-to-surface interactions, needed to form biofilm, are mediated mainly by large externalized adhesion protein LapA.

There are many different pathways to regulate biofilm formation. Well known is the regulation through LapA posttranslational regulation. However, it is possible to regulate biofilm formation through the regulation of the expression of ABC transporter LapEBC which transports LapA to the outer membrane. The more transporters there are in the membrane, the more LapA protein is exported to the cell surface, which promotes biofilm formation. Currently, the information about the regulation of the expression of these transporter proteins is limited.

The goal of this research was to investigate the transcriptional regulation of the transporter protein LapE. It has been previously described that *lapB* and *lapC* are transcribed from the same promoter and *lapE* is transcribed from its own promoter. In addition, previous research in our laboratory has shown that the global transcription regulator Fis (factor for inversion stimulation) promotes biofilm formation. Moreover, another research, conducted *in vitro*, has shown that there are two Fis binding sites on the promoter region of *lapE*. Therefore, this study mainly focuses on investigating the effect that Fis has on *lapE* transcription. The findings of this work can be summarised as follows:

- There is at least one promoter upstream of *lapE* gene. The presence of another promoter is also highly possible.
- The transcription of *lapE* gene is more active in stationary phase than in exponential growth phase.
- Transcription from the promoters upstream of *lapE* gene is independent from the  $\sigma$ -factor RpoS. Although, it is possible that a regulator which transcription is dependent on RpoS binds with the promoter region of *lapE*, upstream of the promoters.

- Experiments conducted in *E. coli* *fis* deletion strain indicate that Fis regulates *lapE* transcription in a concentration dependent manner. While Fis concentration is low, it only binds to its most affine binding site, repressing *lapE* transcription. While Fis concentration is high, it also binds to the second, less affine binding site, activating *lapE* transcription to the wildtype level.

In conclusion, these results indicate that the regulation of *lapE* transcription is rather complicated. This research showed that neither  $\sigma$ -factor RpoS nor a regulator PhoB have a direct effect on the transcription of *lapE* gene, under tested conditions. The experiment conducted in *E. coli*'s *fis* deletion strain showed that Fis affects *lapE* transcription in a concentration-dependent manner. Presumably, there are more regulators that affect the transcription of *lapE* but those were not introduced in this study. Further studies will provide better insight of the transcriptional regulation of *lapE* gene.

## Kasutatud kirjandus

- Azam, T. A., Ishihama, A. (1999).** "Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity." *J Biol Chem* **274**: 33105–33113.
- Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner & H. Mori (2006).** "Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection." *Mol Syst Biol* **2**(1): 2006 0008.
- Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner & H. Mori (2006).** "Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection." *Molecular systems biology* **2**(1).
- Beach, M. B. & R. Osuna (1998).** "Identification and characterization of the *fis* operon in enteric bacteria." *J Bacteriol* **180**(22): 5932–5946.
- Betermier, M., D. J. Galas & M. Chandler (1994).** "Interaction of Fis protein with DNA: bending and specificity of binding." *Biochimie* **76**(10-11): 958–967.
- Boswell, S., J. Mathew, M. Beach, R. Osuna & W. Colon (2004).** "Variable contributions of tyrosine residues to the structural and spectroscopic properties of the factor for inversion stimulation." *Biochemistry* **43**(10): 2964–2977.
- Boyd, C. D., T. J. Smith, S. El-Kirat-Chatel, P. D. Newell, Y. F. Dufrene & G. A. O'Toole (2014).** "Structural features of the *Pseudomonas fluorescens* biofilm adhesin LapA required for LapG-dependent cleavage, biofilm formation, and cell surface localization." *J Bacteriol* **196**(15): 2775–2788.
- Bradley, M. D., M. B. Beach, A. J. de Koning, T. S. Pratt & R. Osuna (2007).** "Effects of Fis on *Escherichia coli* gene expression during different growth stages." *Microbiology* **153**(9): 2922–2940.
- Branda, S. S., A. Vik, L. Friedman & R. Kolter (2005).** "Biofilms: the matrix revisited." *Trends in Microbiology* **13**(1): 20–26.
- Datsenko, K. A. & B. L. Wanner (2000).** "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(12): 6640–6645.
- Dennis, P. G., A. J. Miller & P. R. Hirsch (2010).** "Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities?" *FEMS microbiology ecology* **72**(3): 313–327.
- Donlan, R. M. (2002).** "Biofilms: microbial life on surfaces." *Emerg Infect Dis* **8**(9): 881–890.
- Dorgai, L., J. Oberto & R. A. Weisberg (1993).** "Xis and Fis proteins prevent site-specific DNA inversion in lysogens of phage HK022." *J Bacteriol* **175**(3): 693–700.
- El-Kirat-Chatel, S., A. Beaussart, C. D. Boyd, G. A. O'Toole & Y. F. Dufrene (2014).** "Single-cell and single-molecule analysis deciphers the localization, adhesion, and mechanics of the biofilm adhesin LapA." *ACS Chem Biol* **9**(2): 485–494.
- Ellison, D. W. & W. R. McCleary (2000).** "The unphosphorylated receiver domain of PhoB silences the activity of its output domain." *J. Bacteriol* **182**(23): 6592–6597.
- Espinosa-Urgel, M., C. Chamizo & A. Tormo (1996).** "A consensus structure for sigma S-dependent promoters." *Mol Microbiol* **21**(3): 657–659.
- Espinosa-Urgel, M., A. Salido & J. L. Ramos (2000).** "Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds." *J Bacteriol* **182**(9): 2363–2369.
- Evans, L. V. (2000).** *Biofilms: recent advances in their study and control*. Amsterdam, Harwood Academic Publishers.
- Fassler, J. S. & G. N. Gussin (1996).** "Promoters and basal transcription machinery in eubacteria and eukaryotes: concepts, definitions, and analogies." *Methods Enzymol* **273**: 3–29.

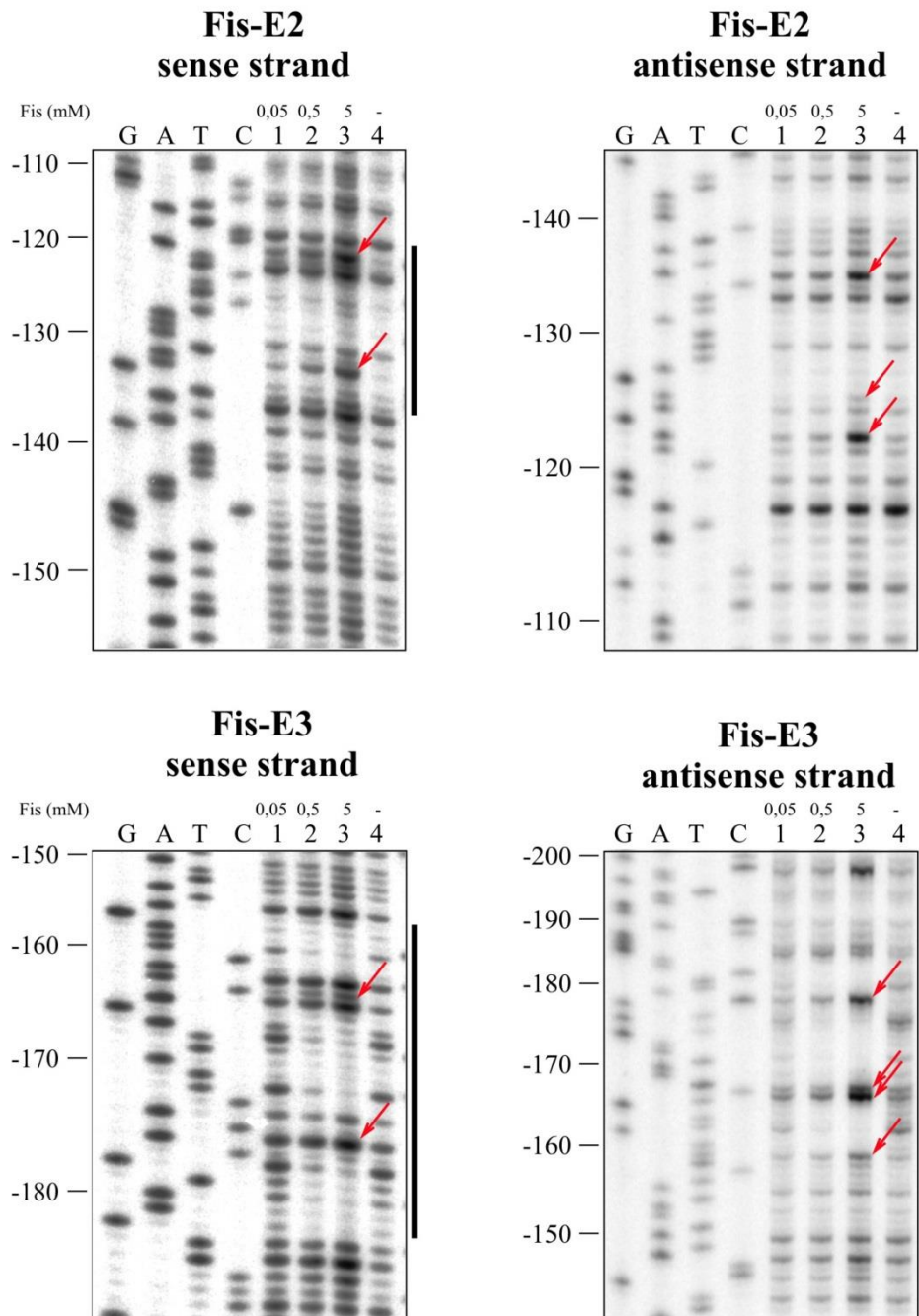
- Finkel, S. E., Johnson, R. C. (1992).** "The Fis protein: it's not just for DNA inversion anymore." *Mol Microbiol* **6**: 3257–3265.
- Garnett, J. A. & S. Matthews (2012).** "Interactions in bacterial biofilm development: a structural perspective." *Current Protein and Peptide Science* **13**(8): 739-755.
- Gross, C. (1996).** "Function and regulation of the heat shock proteins." *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC: 1382-1399.
- Gross, C., C. Chan, A. Dombroski, T. Gruber, M. Sharp, J. Tupy & B. Young (1998).** The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Grossman, A. D., D. B. Straus, W. A. Walter & C. A. Gross (1987).** "Sigma 32 synthesis can regulate the synthesis of heat shock proteins in *Escherichia coli*." *Genes & Development* **1**(2): 179-184.
- Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton & P. Stoodley (2004).** "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases." *Nat Rev Microbiol* **2**(2): 95-108.
- Harley, C. B. & R. P. Reynolds (1987).** "Analysis of *E. coli* promoter sequences." *Nucleic acids research* **15**(5): 2343-2361.
- Harwood, C. S., Fosnaugh, K., Dispensa, M. (1989).** "Flagellation of *Pseudomonas putida* and Analysis of Its Motile Behavior." *J. Bacteriol* **171**: 4063-4066.
- Helmann, J. D. (1991).** "Alternative sigma factors and the regulation of flagellar gene expression." *Mol Microbiol* **5**(12): 2875-2882.
- Helmann, J. D. (1995).** "Compilation and analysis of *Bacillus Subtilis*  $\sigma$ A-dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA." *Nucleic acids research* **23**(13): 2351-2360.
- Hinsa, S. M., M. Espinosa-Urgel, J. L. Ramos & G. A. O'Toole (2003).** "Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein." *Mol Microbiol* **49**(4): 905-918.
- Hinsa, S. M. & G. A. O'Toole (2006).** "Biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365: a role for LapD." *Microbiology* **152**(Pt 5): 1375-1383.
- Hirsch, A. M., W. D. Bauer, D. M. Bird, J. Cullimore, B. Tyler & J. I. Yoder (2003).** "Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms." *Ecology* **84**(4): 858-868.
- Hoiby, N., T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin & O. Ciofu (2010).** "Antibiotic resistance of bacterial biofilms." *Int J Antimicrob Agents* **35**(4): 322-332.
- Jakovleva, J., A. Teppo, A. Velts, S. Saumaa, H. Moor, M. Kivisaar & R. Teras (2012).** "Fis regulates the competitiveness of *Pseudomonas putida* on barley roots by inducing biofilm formation." *Microbiology* **158**(Pt 3): 708-720.
- Johnson, R. C., M. F. Bruist & M. I. Simon (1986).** "Host protein requirements for *in vitro* site-specific DNA inversion." *Cell* **46**(4): 531-539.
- Kimura, S., K. Makino, H. Shinagawa, M. Amemura & A. Nakata (1989).** "Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: characterization of the promoter of the *pstS* gene." *Molecular and General Genetics MGG* **215**(3): 374-380.
- Köhler, T., S. Harayama, J. Ramos & K. Timmis (1989).** "Involvement of *Pseudomonas putida* RpoN sigma factor in regulation of various metabolic functions." *J. Bacteriol* **171**(8): 4326-4333.
- Lahesaare, A., H. Moor, M. Kivisaar & R. Teras (2014).** "*Pseudomonas putida* Fis binds to the *lapF* promoter *in vitro* and represses the expression of LapF." *PloS one* **9**(12): e115901.
- Lange, R. & R. Hengge-Aronis (1991).** "Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*." *Molecular microbiology* **5**(1): 49-59.



- Makino, K., M. Amemura, T. Kawamoto, S. Kimura, H. Shinagawa, A. Nakata & M. Suzuki (1996).** "DNA binding of PhoB and its interaction with RNA polymerase." *Journal of molecular biology* **259**(1): 15-26.
- Makino, K., M. Amemura, S.-K. Kim, A. Nakata & H. Shinagawa (1993).** "Role of the sigma 70 subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in *Escherichia coli*." *Genes & Development* **7**(1): 149-160.
- Makino, K., H. Shinagawa, M. Amemura, T. Kawamoto, M. Yamada & A. Nakata (1989).** "Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins." *Journal of molecular biology* **210**(3): 551-559.
- Martinez-Gil, M., M. I. Ramos-Gonzalez & M. Espinosa-Urgel (2014).** "Roles of cyclic Di-GMP and the Gac system in transcriptional control of the genes coding for the *Pseudomonas putida* adhesins LapA and LapF." *J Bacteriol* **196**(8): 1484-1495.
- Martínez-García, E. & V. de Lorenzo (2011).** "Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440." *Environmental microbiology* **13**(10): 2702-2716.
- Merrick, M. (1993).** "In a class of its own—the RNA polymerase sigma factor  $\sigma_{54}$  ( $\sigma_N$ )." *Molecular microbiology* **10**(5): 903-909.
- Merrick, M., J. Gibbins & A. Toukdarian (1987).** "The nucleotide sequence of the sigma factor gene *ntrA* (*rpoN*) of *Azotobacter vinelandii*: analysis of conserved sequences in NtrA proteins." *Molecular and General Genetics MGG* **210**(2): 323-330.
- Monds, R. D., P. D. Newell, R. H. Gross & G. A. O'Toole (2007).** "Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA." *Mol Microbiol* **63**(3): 656-679.
- Moor, H. (2013).** *Pseudomonas putida* globaalse regulaatori Fis osalus biofilmi moodustumises. Magistritöö, Tartu Ülikool.
- Moor, H., A. Teppo, A. Lahesaare, M. Kivisaar & R. Teras (2014).** "Fis overexpression enhances *Pseudomonas putida* biofilm formation by regulating the ratio of LapA and LapF." *Microbiology-Sgm* **160**: 2681-2693.
- Morris, L., W. Cannon, F. Claverie-Martin, S. Austin & M. Buck (1994).** "DNA distortion and nucleation of local DNA unwinding within sigma-54 (sigma N) holoenzyme closed promoter complexes." *Journal of Biological Chemistry* **269**(15): 11563-11571.
- Navarro, M. V., P. D. Newell, P. V. Krasteva, D. Chatterjee, D. R. Madden, G. A. O'Toole & H. Sondermann (2011).** "Structural basis for c-di-GMP-mediated inside-out signaling controlling periplasmic proteolysis." *PLoS Biol* **9**(2): e1000588.
- Nelson, K., C. Weinl, I. Paulsen, R. Dodson, H. Hilbert, V. Martins dos Santos, D. Fouts, S. Gill, M. Pop & M. Holmes (2002).** "Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440." *Environmental microbiology* **4**(12): 799-808.
- Newell, P. D., C. D. Boyd, H. Sondermann & G. A. O'Toole (2011).** "A c-di-GMP effector system controls cell adhesion by inside-out signaling and surface protein cleavage." *PLoS Biol* **9**(2): e1000587.
- Newell, P. D., R. D. Monds & G. A. O'Toole (2009).** "LapD is a bis-(3', 5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**(9): 3461-3466.
- Palleroni, N. (1984).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore, MD: Williams & Wilkins.
- Pan, C. Q., S. E. Finkel, S. E. Cramton, J. A. Feng, D. S. Sigman & R. C. Johnson (1996).** "Variable structures of Fis-DNA complexes determined by flanking DNA-protein contacts." *J Mol Biol* **264**(4): 675-695.
- Ramos-Díaz, M. A. & J. L. Ramos (1998).** "Combined physical and genetic map of the *Pseudomonas putida* KT2440 chromosome." *J. Bacteriol* **180**(23): 6352-6363.

- Richard, R., A. Andrew, J. J. Dunn & E. K. Bautz (1969).** "Factor stimulating transcription by RNA polymerase." *Nature* **221**: 43.
- Sasse-Dwight, S. & J. D. Gralia (1990).** "Role of eukaryotic-type functional domains found in the prokaryotic enhancer receptor factor  $\sigma$  54." *Cell* **62**(5): 945-954.
- Satchell, K. J. (2011).** "Structure and function of MARTX toxins and other large repetitive RTX proteins." *Annu Rev Microbiol* **65**: 71-90.
- Schneider, R., R. Lurz, G. Luder, C. Tolksdorf, A. Travers & G. Muskhelishvili (2001).** "An architectural role of the *Escherichia coli* chromatin protein FIS in organising DNA." *Nucleic Acids Res* **29**(24): 5107-5114.
- Schneider, R., A. Travers, T. Kutateladze & G. Muskhelishvili (1999).** "A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **34**(5): 953-964.
- Schneider, R., A. Travers & G. Muskhelishvili (1997).** "FIS modulates growth phase-dependent topological transitions of DNA in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **26**(3): 519-530.
- Spaink, H. P. (1995).** "The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: the ins and outs of symbiogenesis." *Annual review of phytopathology* **33**(1): 345-368.
- Sutherland, I. W. (2001).** "The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment." *Trends in Microbiology* **9**(5): 222-227.
- Timmis, K. N. (2002).** "*Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence." *Environ Microbiol* **4**(12): 779-781.
- Travers, A., R. Schneider & G. Muskhelishvili (2001).** "DNA supercoiling and transcription in *Escherichia coli*: The FIS connection." *Biochimie* **83**(2): 213-217.
- Waite, R. D., A. Paccanaro, A. Papakonstantinou, J. M. Hurst, M. Saqi, E. Littler & M. A. Curtis (2006).** "Clustering of *Pseudomonas aeruginosa* transcriptomes from planktonic cultures, developing and mature biofilms reveals distinct expression profiles." *BMC genomics* **7**(1): 162.
- Wanner, B. (1993).** "Gene regulation by phosphate in enteric bacteria." *Journal of cellular biochemistry* **51**(1): 47-54.
- Weller, D. M. (1988).** "Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria." *Annual review of phytopathology* **26**(1): 379-407.
- Winsor, G. L., D. K. Lam, L. Fleming, R. Lo, M. D. Whiteside, Y. Y. Nancy, R. E. Hancock & F. S. Brinkman (2011).** "*Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes." *Nucleic acids research* **39**(suppl 1): D596-D600.
- Yousef-Coronado, F., M. L. Travieso & M. Espinosa-Urgel (2008).** "Different, overlapping mechanisms for colonization of abiotic and plant surfaces by *Pseudomonas putida*." *FEMS microbiology letters* **288**(1): 118-124.
- Yousef, F. & M. Espinosa-Urgel (2007).** "*In silico* analysis of large microbial surface proteins." *Res Microbiol* **158**(6): 545-550.

**A**



**Lisa 1** DNAas I jalajälg Fis-i seondumisest *lapE* promootorala DNA-ga. Joonisel on märgitud Fis valgu kontsentratsioon ( $\mu\text{M}$ ) reaktsioonides ning kaugus geeni startkoodonist. Vertikaalse musta pideva joonega on tähistatud Fis valgu seondumisjärjestus. Punaste nooltega on näidatud DNAas I lõikusele hüpersensitiivsed alad. Fis-E2 seondumissaidi puhul on näha, et tumedad vöödid tekivad ainult suurima Fis-i kontsentratsiooni korral, millest võib arvata, et tegu on nõrga seondumissaidiga. Fis-E3 puhul aga tekivad tumedad vöödid juba vähesel Fis-i kontsentratsiooni korral, seega seondub arvatavasti Fis sinna piirkonda suurema afiinsusega.

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina Johana Koppel (23.05.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „ *Pseudomonas putida* transporteri geeni *lapE* transkriptsiooni sõltuvus globaalsetest regulaatoritest“,

mille juhendajad on Hanna Moor ja Riho Teras

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **24.05.2019** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2016